

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-313000

(43)公開日 平成6年(1994)11月8日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/14		8318-4H		
A 6 1 K 37/02	A B Y	8314-4C		
C 1 2 N 5/10		9050-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		8412-4B	5/ 00	B

審査請求 未請求 請求項の数18 F D (全 25 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-197752

(22)出願日 平成5年(1993)7月16日

(31)優先権主張番号 特願平4-212305

(32)優先日 平4(1992)7月17日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(31)優先権主張番号 特願平5-67339

(32)優先日 平5(1993)3月4日

(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000001904
サントリー株式会社
大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(72)発明者 辻本 雅文
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 栗原 達也
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 石田 信宏
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内

(74)代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

最終頁に続く

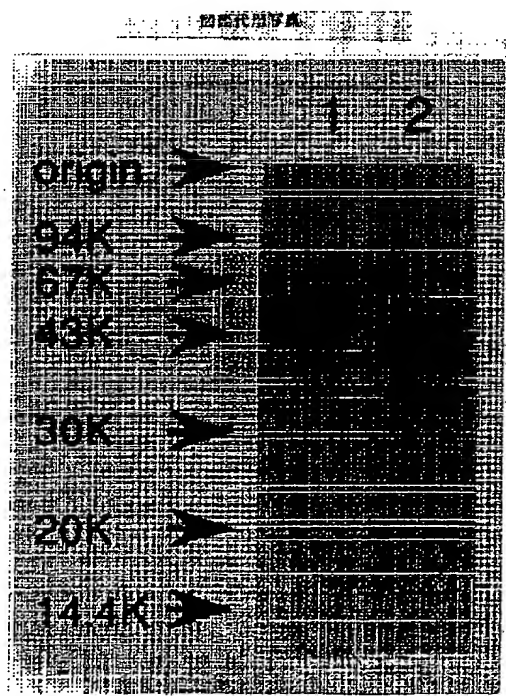
(54)【発明の名称】 巨核球増殖分化因子

(57)【要約】

【目的】 新規な巨核球増殖分化因子を提供する。

【構成】 下記性質：

- (1) 巨核球の増殖および成熟分化を促進する；
- (2) ゲル濾過及びSDS-PAGEの分析による分子量が55～57kDを示し、分子間ジスルフィド結合を待たない；
- (3) 等電点6.5±0.5を示す；及び
- (4) 配列番号1～9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列を有する；を有する巨核球成熟分化因子、例えば、配列番号：30に示すアミノ酸配列を有する巨核球成熟分化因子及びその製造方法、並びにそれをコードする遺伝子、例えば配列番号：30に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記性質を有する巨核球増殖分化因子：

- (1) 巨核球の増殖および成熟分化を促進する；
- (2) ゲル濾過及びSDS-PAGEの分析による分子量が55～57kDを示し、分子間ジスルフィド結合を持たない；
- (3) 等電点6.5±0.5を示す；及び
- (4) 配列番号1～9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列を有する。

【請求項2】 ヒト細胞によって生産される請求項1に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項3】 ヒト癌細胞により生産される請求項2に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項4】 ヒト類表皮癌細胞A431由来の細胞によって生産される請求項3に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項5】 無蛋白質培地で増殖させたヒト類表皮癌細胞A431由来の細胞によって産生される請求項4記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項6】 請求項1記載の巨核球増殖分化因子と同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1～複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有し、遺伝子組換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる巨核球増殖分化因子。

【請求項7】 配列番号：30に示すアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列あるいは該アミノ酸配列または一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1～複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する請求項6に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項8】 糖鎖が結合したものである請求項6または7記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項9】 N-末端が生化学的又は化学的に修飾されている、請求項6～8のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項10】 翻訳開始のメチオニンが除去され、それに続くアラニンがアセチル化されている、請求項9に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項11】 配列番号1～9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドを用いて遺伝子組換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる請求項6～10のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子。

【請求項12】 請求項1～11のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列をコードする遺伝子。

【請求項13】 請求項12に記載の遺伝子を含んで成る発現ベクター。

2

【請求項14】 請求項13に記載の発現ベクターにより形質転換された宿主。

【請求項15】 請求項1～11のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子を有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項16】 血小板減少症治療薬である請求項15に記載の医薬組成物。

【請求項17】 請求項1～11のいずれか1項に記載の巨核球増殖分化因子を抗原とする抗体。

【請求項18】 請求項14に記載の宿主を培養又は飼育し、巨核球増殖分化因子を採取することを特徴とする、巨核球増殖分化因子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、巨核球増殖分化因子及びそれをコードする遺伝子に関する。さらに詳細には、巨核球-血小板系造血の促進因子として有用な巨核球増殖分化因子、その製造方法、及びその使用に関する。

【0002】

【従来の技術】 各種血液細胞が、造血幹細胞から成熟血球に至る過程において、その増殖と分化を誘導する種々の造血因子が関与することは周知の事実である。血小板の寿命はヒトで9～10日と短い、血液中の血小板濃度は定常状態においてほぼ一定に保たれている。また実験動物において種々の方法で血小板を減少させても、数日のうちに血液中に血小板数の回復が認められている。これらのことから血小板減少期において血小板の産生を促進する因子が存在することが想定され、その因子を同定することに従来より多くの努力がはられてきた。

【0003】 巨核球血小板系造血において血小板の前駆細胞である巨核球の形成には少なくとも2種類の調節因子が関与するものと考えられている。第1の因子は単独で巨核球コロニーを形成するもので巨核球コロニー刺激因子と呼ばれる。第2の因子は単独では巨核球コロニーを形成させる活性はないが、前者を共存させると巨核球のコロニー数を増やしたり、その増殖分化を促進する作用を有するもので巨核球増幅因子と呼ばれる。

【0004】 前者に属するものとして、インターロイキン3、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子が、後者として、エリトロポエチン、マクロファージコロニー刺激因子、インターロイキン6、7及び11、LIFなどが知られている。またこれらの因子のなかには実際に *in vivo* において血小板数の増加や回復時期の短縮などの効果が認められているものもある（溝口秀昭：蛋白質核酸酵素 361195 '91）。【0005】 しかしこれらの因子の多くは巨核球/血小板系の増殖や分化のみではなく各系統の血球の分化にも関与するなど極めて多様な生物活性を示す。例えばIL-6およびIL-11には実際に *in vivo* における血小板の増多作用があるが急性期蛋白質の産生を促し

3

たり、著しい場合には悪液質をひきおこす。またIL-6の場合、腎臓のメサンギウム細胞を増殖させ腎不全を起こす可能性があるなど臨床応用上の問題点も多い(松田正ら:蛋白質核酸酵素 36 1184 '91)。また血小板減少期においてIL-6は血中で高値を示さず生理的因子とは考えられていない。

【0006】血小板は、止血機構において重要な役割を果たしている。血小板減少を伴う疾患(Fanconi症候群、巨核球性血小板減少症、再生不良性貧血等)は臨床的には危険な疾患であり、特に出血した場合にはそれをコントロールできなくなるような状態になる。従って血小板の産生を促進する因子を単離同定することは、このような危険を回避するうえで有益であろうと考えられる。

【0007】また、骨髓移植は近年白血病等の有力な治療法になりつつあるがその成功率はEPO、G-CSF等のサイトカインの使用により上昇している。現在の問題点は血小板減少で、その増多因子が得られれば成功率はさらに上昇し、入院期間も短縮できると期待される。造血疾患に限らずがん化学療法や放射線療法時の血小板減少にも血小板増多因子でコントロールできよう。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記既知因子の持つ問題点に鑑み、血小板減少または血小板の機能低下を伴う疾患に有効な血小板の産生を促進する因子を見出すべく、鋭意研究を重ねた結果、巨核球の増殖および成熟分化を促進する新規因子を見出し、該因子をコードする遺伝子をクローニングし、さらに該遺伝子を有する発現ベクターを作製し、本発明の完成に至った。

【0009】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、下記性質を有する巨核球増殖分化因子:

- (1) 巨核球の増殖および成熟分化を促進する;
- (2) ゲル濾過及びSDS-PAGEの分析による分子量が55~57kDを示し、分子間ジスルフィド結合を持たない;
- (3) 等電点6.5±0.5を示す;および
- (4) 配列番号1~9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つの配列を有する;に関する。

【0010】本発明の巨核球増殖分化因子の生成原料としては、ヒト細胞、例えばヒト癌細胞、好ましくはヒト類表皮癌細胞A431、特に好ましくは無蛋白質培地で増殖させた、ヒト類表皮癌細胞A431由来の細胞があげられる。また、本発明は、上記巨核球増殖分化因子と同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1~複数個のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列を有し、遺伝子組換え技術によって造成された形質転換細胞の培養物から得られる巨核球増殖分化因子にも関する。

4

【0011】さらに、配列番号:30に示すアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該アミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1~複数個のアミノ酸が付加されたアミノ酸配列を有する巨核球増殖分化因子に関する。本発明はさらに、前記巨核球増殖因子をコードする遺伝子に関する。本発明はさらに、該遺伝子を用いての、遺伝子組換え技術による巨核球増殖因子の製造方法にも関する。

【0012】遺伝子組換え技術は、上記巨核球増殖分化因子と同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列、あるいは該同一のアミノ酸配列またはその一部が欠失もしくは置換したアミノ酸配列に1~複数個のアミノ酸配列が付加されたアミノ酸配列をコードする合成または天然のポリヌクレオチドを用いて既知の手法に従って行えばよく、とくに限定されないが、シグナル配列の付加や改良、宿主-ベクター系の好適選択、遺伝子の発現制御部位の改良等により発現効率の調節などを図ることができる。また、宿主の選択により糖鎖が結合されたものとして得てもよい。さらに、配列番号1~9に示すアミノ酸配列のうち少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドを遺伝子クローニング用のDNAプローブとして用いてもよい。本発明はさらにまた、本巨核球増殖分化因子を有効成分として含有する医薬組成物を提供し、血小板減少症治療薬として好ましくは用いられる。また、本巨核球増殖分化因子を用いれば、公知の手法により、特異的抗体を得ることもできる。

【0013】

【具体的な説明】

(1) 材料

本発明の新規タンパク質の生成原料として、例えば、無タンパク質培地においてYamaguchiらの方法(Yamaguchi, Nら、Cancer Res. 50 7008 '91)により増殖可能となったヒト類表皮癌細胞A431(ATCC CRL 1555)由来の細胞の培養上清を用いる。本細胞はHuman epidermoid Carcinoma SBM330と命名されて、工業技術院微生物工学技術研究所に1992年7月1日付で微生研条寄3911号(FERM BP-3911)として寄託されている。

【0014】(2) 巨核球増殖分化因子の測定法

巨核球の増殖分化因子の測定には、巨核球系細胞株(例えばCMK細胞やそれ由来の細胞)、マウス骨髓細胞等を用いることができ、例えばマウス骨髓細胞を用いて、齧歯類の巨核球において特異的に検出されることが知られているアセチルコリンエステラーゼの活性測定をIshibashiらの方法(Ishibashi, T.ら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 5953 '89)で行う。また巨核球の組織化学的

5

な検出は、骨髓細胞を培養後アセチルコリンエステラーゼ染色及びメイ＝グリュンワルド＝ギムザ染色を行い染色された細胞の形状を判定することにより行う。

【0015】(3) 巨核球増殖分化因子の精製

巨核球増殖分化因子の精製は、例えば、A431細胞の無タンパク質培養上清を出発材料とし、限外ろ過により濃縮後、カラムクロマトグラフィー、例えばMatrex Blue A (アミコン社)、Q-セファロース (ファルマシア社)、フェニルセファロース (ファルマシア社)、S-セファロース (ファルマシア社)、ハイロード26/60 スーパーデックス75 (ファルマシア社)、の各カラムクロマトグラフィーを順次組み合わせで行える。タンパク質はA₂₈₀ nmを測定することによりモニターする。

【0016】(4) 巨核球増殖分化因子の部分アミノ酸配列の決定：アミノ酸配列の構造を知るため、(3)で精製した巨核球増殖分化因子画分をプロテアーゼ (例えばアクロモバクターProtase I (API)) を加え37℃2時間処理してフラグメント化する。得られたペプチド断片をYMC-Pack AM-303カラムによる逆相HPLC (0.1% トリフルオロ酢酸存在下アセトニトリル勾配形成) により分取する。得られたペプチド断片をシーケンサー、例えばApplied Biosystem社製gas-phaseシーケンサーにかけアミノ酸配列を決定する。上記の巨核球増殖分化因子の具体的な精製方法、及び詳細な性質は実施例1に記載する。

【0017】本発明はまた、上記の巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子はmRNAからのcDNA、ゲノムDNA、化学合成DNAのいずれであってもよい。cDNAは、例えば、前記のようにしてヒト細胞、例えばヒト類表皮癌細胞、例えばA431細胞株から精製した巨核球増殖分化因子の、実施例1に示すような部分アミノ酸配列に基づいて設計したDNA (ヌクレオチド) プライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) によりクローニングすることができる。クローニングの具体的な1例を実施例2に示す。

【0018】本発明の遺伝子はさらに、巨核球増殖分化因子活性を有する蛋白または糖蛋白をコードし、配列番号：30のヌクレオチド配列とハイブリダイズするDNAも含まれる。実施例2においてクローニングされた、本発明の巨核球増殖因子をコードするDNAのヌクレオチド配列及び該ヌクレオチド配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号：30に示す。

【0019】こうして、一旦アミノ酸配列が決定されれば、この天然アミノ酸配列に1～複数のアミノ酸が付加されておりなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列から1～複数のアミノ酸が除去されておりなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチド、前記天然アミノ酸配列中の1～複

6

数個のアミノ酸が他のアミノ酸により置き換えられておりなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチド、さらには、上記のアミノ酸付加変異、アミノ酸除去変異及びアミノ酸置換変異が組合わされた変異を有しなお巨核球増殖因子活性を維持しているポリペプチドなど、種々の変異型巨核球増殖因子を設計し、それを製造することができる。

【0020】上記アミノ酸の付加、除去及び置換等の変異におけるアミノ酸の数は、特に限定されないが、付加については、例えば、本発明の巨核球増殖分化因子とのハイブリッド蛋白に用いられる機能性蛋白のアミノ酸の数 (例えば、マルトースバインディングプロテイン (maltose-binding protein) 等の公知の抽出精製もしくは安定化用蛋白または各種生理活性蛋白、例えばIL-3、IL-11のようなサイトカイン) や本因子に付加されたシグナルペプチドのそれに依存し、すなわち、当該変異の目的に依存して決定される。例えば、1～30、好ましくは、1～10の付加があげられる。

【0021】また、除去については、除去されるアミノ酸の数は、巨核球増殖活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～30、好ましくは1～20、また、本因子の活性領域以外の領域のアミノ酸の数があげられる。さらに、置換については、置換されるアミノ酸の数は、巨核球増殖活性が維持されるように設計、決定され、例えば、1～10、好ましくは、1～5があげられる。

【0022】本発明においては、巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子のヌクレオチド配列として配列番号：30に示すヌクレオチド配列を開示するが、本発明の巨核球増殖分化因子の遺伝子はこれに限定されない。一旦、天然巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列が決定され、又は変異型巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列が設計されれば、コドンの縮重に基づき、同じアミノ酸配列をコードする種々のヌクレオチド配列を設計し、それを調製することができる。この場合、使用すべき宿主により高頻度で用いられるコドンを使用するのが好ましい。

【0023】本発明の天然巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子を得るには、実施例2に記載する様にしてcDNAを得ることができるが、これに限定されない。すなわち、天然巨核球増殖分化因子のアミノ酸配列をコードする1つのヌクレオチド配列が決定されれば天然巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子は、本発明に具体的に開示するストラテジーとは異なるストラテジーによりcDNAとしてクローニングすることができ、さらにはそれを生産する細胞のゲノムからクローニングすることもできる。

【0024】ゲノムからクローニングする場合、実施例2において使用した種々のプライマーヌクレオチド又はプローブヌクレオチドを、ゲノムDNA断片の選択のた

7

めプローブとして使用することができる。また、配列番号：30に記載するヌクレオチド配列に基いて設計された他のプローブを用いることもできる。ゲノムから目的とするDNAをクローニングするための一般的方法は当業界においてよく知られている（Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第5章及び第6章）。

【0025】本発明の天然巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子はまた、化学合成によっても調製することができる。DNAの化学合成は当業界において自動DNA合成機、例えばアプライドバイオシステム社396DNA/RNA合成機など採用して容易である。従って、当業者は、配列番号：30に示されるヌクレオチド配列のDNAを容易に合成することができる。

【0026】本発明の天然型巨核球増殖分化因子を生来のコドンとは異なるコドンによりコードする遺伝子、及び変異型巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子は、前記のごとく化学合成により調製することもでき、また配列番号：30又は図11～14に示すヌクレオチド配列を有するDNA又はRNAを鋳型として変異誘発プライマーと共に用いる部位特定変異誘発法（site-directed mutagenesis）等常法に従って得ることもできる（例えば、Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、第8章を参照のこと）。

【0027】上記のようにして本発明の巨核球増殖分化因子の遺伝子が得られると、これを用いて、常用の遺伝子組換え法により組換え巨核球増殖分化因子を製造することができる。すなわち、本発明の巨核球増殖分化因子をコードするDNAを適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞に導入し、該宿主細胞を培養し、そして得られた培養物（細胞又は培地）から目的とする巨核球増殖分化因子を採取する。本発明の巨核球増殖分化因子は、生化学的又は化学的な修飾、例えば、N末端アシル化等されて得られてもよい。

【0028】また、配列番号：30のヌクレオチド配列に示される翻訳領域に基づき、蛋白質のデータベースをfastaプログラム（GCGパッケージ）によって検索を行ったところ、巨核球増殖分化因子は、セリンプロテアーゼ阻害因子のスーパーファミリーに属し、またこのファミリーに属し、N末端の長さ、予想立体構造、疎水性、親水性アミノ酸の分布が、本巨核球増殖分化因子と似ているヒト白血球エラスターゼ阻害因子、ニワトリオボアルブミンY遺伝子産物、ヒトプラスミノゲンアクトベクター阻害因子2、ヒトsquamous cell carcinoma抗原において、N末端が、切断除去を受けないシグナルペプチドを形成している。本巨核球増殖分化因子も、N末端がシグナルペプチドとしての機能を有し、かつ、切断されずにそのままの形で分泌されることもありうる。さらに、開始メチオニンの次

8

がアラニンであることより、一般に述べられているように本巨核球増殖因子は、開始メチオニンが脱離しアラニンがアセチル化されていてもよい。

【0029】宿主としては原核生物又は真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、特に大腸菌（*Escherichia coli*）、バチルス属（*Bacillus*）細菌、例えばバチルス・ズブチリス（*B. subtilis*）等を用いることができる。真核生物としては酵母、例えばサッカロミセス（*Saccharomyces*）属酵母、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）、等の真核性微生物、昆虫細胞、例えば、ヨガ細胞（*Spodoptera frugiperda*）、キャベツルーバー細胞（*Trichoplusia ni*）、カイコ細胞（*Bombyx mori*）、動物細胞、例えばヒト細胞、サル細胞、マウス細胞等を使用することができる。本発明においてはさらに、生物体それ自体、例えば昆虫、例えばカイコ、キャベツルーバー等を用いることもできる。

【0030】発現ベクターとしては、プラスミド、ファージ、ファージミド、ウィルス（バキュロ（昆虫）、ワクチニア（動物細胞））等が使用できる。発現ベクター中のプロモーターは宿主細菌に依存して選択され、例えば細菌用プロモーターとしてはlacプロモーター、trpプロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えば、adh1プロモーター、pqkプロモーター等が使用される。また、昆虫用プロモーターとしてはバキュロウィルスポリヘドリンプロモーター等、動物細胞としてはSimian Virus 40のearlyまたはlateプロモーター等があげられる。

【0031】発現ベクターによる宿主の形質転換は、当業界においてよく知られている常法により行うことができ、これらの方法は例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 社、に記載されている。形質転換体の培養も常法に従って行うことができる。培養物からの巨核球増殖分化因子の精製は、タンパク質を単離・精製するための常法に従って、例えば、限外濾過、各種カラムクロマトグラフィー、例えばセファロースを用いるクロマトグラフィー等により行うことができる。

【0032】

【実施例】次に実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1. 巨核球増殖分化因子の単離精製

1) A431細胞の培養

無タンパク質培地に馴化させたA431細胞由来の凍結保存株SBM330を解凍後、初期培地（10%牛胎児血清を含むHam's F12培地）で培養した。

【0033】すなわち、150cm²の培養面積をもつTフラスコ10本に細胞をまき、細胞がコンフルエントに

なるまで37℃にて5%CO₂の存在下で培養した。次に、0.25%トリプシン液(千葉血清)で細胞を剥離した後、850cm²の培養面積をもつローラーボトル10本に継代培養した。37℃、0.5rpmで約3日間培養した結果、1.8×10⁹細胞を回収した。回収した細胞を、Opti-cell培養器(チャールス・リバー Inc., Wilmington, MA)のセラミックコア(S-451)に付着せしめ、初期培地10Lで還流培養を開始した。

【0034】還流培養は、37℃で150mmHgの酸素を供給しながら行った。また、初期培地から無タンパク質培地への置換は次の様にして完結した。すなわち、初期培地で約7日間培養後、無タンパク質培地を20l/dayの割合で供給し、かつ、同割合で培養系から培養上清を回収した。この結果、約100Lの無タンパク質培地を供給することにより、血清を含む初期培地は、無タンパク質培地にほぼ置き換えられた。以後、細胞培養上清を連続的に回収することにより、1000Lの細胞培養上清を得た。得られた細胞培養上清の一部(約300L)を限外ろ過膜(ミリポア、Bedford, MA; MW 10,000カット)で2Lにまで濃縮し、20mMTris/HClバッファー(pH7.4)に対して充分透析したものを精製に供した。

【0035】2) マウス骨髓細胞による巨核球増殖分化因子の測定

雌性BDF₁マウスの大腿骨から骨髓細胞を押し出しα-MEM培地(Flow Laboratories, Inc., McLean, VA, US)に懸濁した。密度の異なるパーコール(ファルマシアLKB バイオテクノロジー、東京)溶液を重層し骨髓細胞懸濁液をのせて400gで20分遠心した。d=1.07/1.08(g/ml)のインターフェイスに集まった単核球を10%FBSを含むα-MEMで一度洗った後、0.5mMジイソプロピルフルオロフォスフェートを含む同培地に再懸濁しプラスチックの細胞培養皿(Corning, Corning, NY, US)に入れ、37℃、5%二酸化炭素-95%空気の条件下で2日間培養した。途中1時間目に培養皿を新しいものに替えた。培養後細胞を10%FBS/α-MEMで3度洗った。

【0036】このようにして得た非付着性骨髓単核球細胞を10%FBS/1%BSA/0.1mM 2-メルカプトエタノール/α-MEMに懸濁し96穴マイクロプレート(Corning)中に一穴あたり5×10⁴細胞を播いた。必要に応じてテストサンプルに25U/mlマウス組み換え型IL-3(Genzyme Corporation, Cambridge, MA, US)、1~2μg/ml抗IL-6抗体(Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)を添加した。抗IL-6抗体を加える時は細胞をシードする前にテストサンプルと抗体を37℃で1時間前

培養した。

【0037】培養は5%CO₂-5%O₂-90%窒素存在下37℃で4~5日間行った。培養後マイクロプレートの各穴の細胞を2回PBSで洗った後180μlの0.2%(w/v)トリトン X-100, 1mMEDTA, 0.12M NaCl, 50mM HEPES, pH7.5で細胞をライシスさせ次に基質の5.6mMヨウ化アセチルチオコリンを20μl加えた。室温で1時間振とう培養した後各穴から20μlの液を蛍光測定用のマイクロプレート(Dynatech MicroFLUOR "B" Plate)に移した。

【0038】これに20μlの0.4mM 7-diethylamino-3-(4'-maleimidyl phenyl)-4-methylcoumarin inアセトニトリル、160μlの0.2%(w/v)トリトン X-100, 1mMEDTA, 50mM Na acetate pH5.0を加えた後蛍光エミッションをフルオロメーターで読んだ(励起、365nm, エミッション450nm)。

【0039】染色用には細胞をサイトスピンで遠心しスライドグラスにはりつけた。アセチルコリンエステラーゼ染色は細胞を5%グルタルアルデヒド、10mMリン酸バッファー、pH6.7で15分固定後溝口の方法(血液幹細胞培養法、中外医学社(1986)三浦恭定編 p.82-88)に従ってアセチルチオコリンを基質として行った。

【0040】すなわち固定後スライドグラスを0.1Mリン酸バッファーpH6で洗浄し、次に各スライドグラスに1.5mlの0.67mg/mlヨウ化アセチルチオコリン、0.1Mリン酸バッファー(pH6.0)、0.2mlの30mM CuSO₄、0.2mlの5mMフェリシアン化カリウム、0.1mlの0.1Mクエン酸ナトリウムの混合液をのせ、室温で4時間インキュベートした後、水洗いした。メイ=グリュンワルド=ギムザ染色は血液学で周知の方法でありE.メルク社(Darmstadt, FRG)の各試薬を用いてメイ=グリュンワルド染色4分、ギムザ染色10分で行った。

【0041】3) 巨核球増殖分化因子の精製

A431細胞培養上清濃縮液を透析後遠心し、その上清を20mM Tris/HClバッファー(pH7.4)で平衡化したMatrex Blue Aカラムにかけ、同一バッファーで充分洗浄後2M NaClを含む同バッファーで結合画分を溶出した。前記測定法により検出した巨核球増殖分化因子活性は結合画分に見出された。そこで同画分を20mM Tris/HClバッファー(pH7.4)で透析後同一バッファーで平衡化したQ-セファロースカラムにかけ、十分洗浄後NaClの勾配により巨核球増殖分化因子を溶出させた(図1参照)。同因子はNaCl0.3~0.5M付近に溶出された。

【0042】Q-セファロースで得られた活性画分に硫

安30%飽和相当分を加え、30%飽和硫酸を含む20mM Tris/HCl バッファー (pH7.4) で平衡化したフェニルセファロースカラムにかけた。巨核球増殖分化因子は硫酸(30%→0%)、エチレンジクロム(0→50%)の濃度勾配を同時に形成させることにより溶出させた(図2参照)。抗IL-6抗体存在下で測定した巨核球増殖分化因子活性は濃度勾配形成の初期に広範囲にわたって認められた。

【0043】得られた画分は50mM MES/NaOHバッファー (pH6.0) に対して充分透析後、同一バッファーで平衡化したS-セファロースカラムにかけた。結合画分の溶出は0~0.5MのNaClにより濃度勾配を形成されることにより行った(図3参照)。活性は極めて広範囲に分布したが濃度勾配形成の初期に比較的高い活性が認められた。S-セファロースにより得られた画分を逐次ハイロード26/60スーパーデックス75(ファルマシア)カラムにかけゲルろ過を行った。カラムは予めPBsにより平衡化し、同バッファーにより溶出させた(図4参照)。巨核球増殖分化因子活性は分子量55~57kDa付近に溶出された。

【0044】以上の各ステップによりSDS-PAGE分析によっても55~57kDa付近に2本のバンドを示す画分がA431由来細胞培養上清3001より約80μg得られた。(図5参照)。この2本のバンドは活性の消長と良好な相関性(図1)を示した。従って本画分で観察された2本のバンドが求める巨核球増殖分化因子であると結論した。

【0045】4) 巨核球増殖分化因子の性質

本発明における因子は下記の性質を有する。

1) 分子量: 約55kDa (ゲルろ過及びSDS-PAGE) (図4及び図5)

SDS-PAGEにおいては2本のバンドとして検出されるが、還元、非還元条件による移動度の差はない、従って分子間ジスルフィド結合を有さない。

2) 等電点: 6.5±0.5 (図6)

当該範囲に数本のバンドとして検出される。

【0046】3) 上記に示される本因子の不均一性は糖タンパク質の糖鎖構造の不均一性として説明可能である。すなわち本因子をアスパラギン結合糖鎖除去酵素であるエンドグリコシダーゼFで処理すると本因子のSDS-PAGE上での分子量が約40kDaに減少するとともに不均一性の低下が認められる(図7)。またSDS-PAGE上で単一バンドを示す画分と2本のバンドを示す画分をAPIにより消化し、逆相HPLCによる分画でペプチドマップを作製した場合においても両方で差が認められない。

4) 本因子は配列番号1~9に示されるアミノ酸配列の少なくとも1つを含有する。

【0047】5) 生物活性

精製された巨核球増殖分化因子およびIL-3の存在下

においてマウス骨髄細胞を培養すると巨核球数の増加及び成熟分化が観察される(図8、9及び10)。図8は培養後の巨核球アセチルコリンエステラーゼ活性を測定した結果であり、図9は培養後、細胞をアセチルコリンエステラーゼ染色した結果(×20)であり、そして図10は培養後、細胞をメイ=グリュンワルド=ギムザ染色した結果(×100)である。図9及び図10のいずれにおいても巨核球増殖分化因子の存在下(B)においてその非存在下(A)よりも巨核球が増加していることがわかる。

【0048】5) 巨核球増殖分化因子の構造

精製した本因子の構造を解析する目的で、本因子をAPI消化し、各ペプチド断片の構造決定を試みた。API消化後逆相HPLCにより各ペプチド断片を回収し、適当な画分について構造決定を行った結果、各ペプチド断片は配列表1~9に示すアミノ酸配列を有していた。

【0049】実施例2. 巨核球増殖因子cDNAの構造決定

1. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析(1)

アミノ酸配列のうち配列番号: 3及び4より、そのアミノ酸配列をコードする遺伝子配列を推測しそれぞれオリゴマーNI065(配列番号: 10; 配列番号: 30の449~486に対応)及びNI067(配列番号: 11; 配列番号: 30の1049~1080に対応)を合成した。

【0050】A431細胞よりISOGEN(和光純薬)を用いて、添付の操作指示書にしたがって、全RNAを精製した。このRNAより、ポリAを有するRNAを精製し、3'-RACE Kit(Gibco BRL)を用い、反応を行った。上記のオリゴマーNI065と3'-RACE Kit(Gibco BRL)添付のオリゴマー3'-RACE アダプター・プライマー(配列番号: 12)を用いて添付の操作指示書にしたがってポリメラーゼチェーン反応(PCR)を行った。

【0051】この反応産物を用いさらにNI067と3'-RACE Kit(Gibco BRL)添付のオリゴマー3'-RACE アダプター・プライマーを用いて再びPCRを行うことによりおよそ900塩基対のDNA断片を得た。次いで、U. Gyllenstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 7652(1988)に基づき、PCR産物の直接塩基配列決定法を採用し、このおよそ900塩基対のDNA断片をそのまま反応基質として用い蛋白質を指示する部分とその下流の塩基配列を、アプライドバイオシステムズ社のTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencingキットと蛍光塩基配列決定装置(アプライドバイオシステムズ社370A型機)を採用し、添付の操作指示書にしたがって決定した。その結果、配列番号: 30のヌクレオチド番号1081より1950の配列が明らかに

13

なった。

【0052】この配列よりオリゴマーKY100（配列番号：13；配列番号：30の1255～1236の相補鎖に対応）を合成した。NI065と3'-RACE Kit (Gibco BRL) 添付のオリゴマー3'-RACE アダプター・プライマーを用いてPCRを行った反応産物を反応基質として用いさらにNI065とKY100を用いてPCRを行い、807塩基対のDNA断片を得た。

【0053】この807塩基対のDNA断片をそのまま反応基質としてその塩基配列をアプライドバイオシステムズのTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencingキットと蛍光塩基配列決定装置を採用し、添付の操作指示書にしたがって決定した。その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号487より1080の配列が明らかになった。この配列よりオリゴマーNI073（配列番号：14；配列番号：30の864～886に対応）、NI074（配列番号：15；配列番号：30の1012～992の相補鎖に対応）及びNI075（配列番号：16；配列番号：30の802～782の相補鎖に対応）を合成した。

【0054】2. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析（2）

A. 巨核球増殖分化因子発現細胞株（A431）由来のmRNAの調製

ヒト類表皮癌細胞株（A431）の凍結細胞1.1gから、Pharmacia-LKB社のRNA抽出キット及びmRNA精製キットを用いて、25μgのmRNAを抽出・精製した。

【0055】B. 巨核球増殖分化因子発現細胞株（A431）由来のcDNAファージ・ライブラリーの調製

（1）cDNAの合成

A431由来のmRNA5μgから、Pharmacia-LKB社のTime Saver cDNA合成キットを用いて、cDNAを合成した。まず、ジエチルピロカーボネート（DEPC）処理蒸留水20μlに溶解したmRNA5μgを65℃にて10分間加熱した後、氷上で冷却した。ファースト・ストランド反応混合液11μl、DTT溶液1μl、Directional Cloning Tool box (Pharmacia-LKB社) 添付の130 OD/ml Not I/オリゴマ（dT）18プライマー溶液（Pharmacia-LKB社）1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。

【0056】反応物をセカンド・ストランド反応混合液に添加し、12℃にて30分間、22℃にて1時間保温した後、65℃にて10分間加熱した。100μlのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール（25：24：1、以下PCと略す）を加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセフ

14

アクリルS-400スピンカラム（Pharmacia-LKB社）を用いて分画し、100μlのcDNA溶液を得た。

【0057】（2）EcoRIアダプターの付加

100μlのcDNA溶液に100D/ml EcoRIアダプター（Pharmacia-LKB社）5μl、ポリエチレングリコール緩衝液30μl、1/5希釈ATP溶液1μl及びT4DNAリガーゼ1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。65℃にて10分間加熱した後、ATP溶液1.5μl及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ1μlを添加し、37℃にて30分間保温した。65℃にて10分間加熱した後、20U/μl Not I 2μlを添加し、37℃にて1時間保温した。150μlのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセファクリルS-400スピンカラムを用いて分画し、150μlのcDNA溶液を得た。

【0058】（3）cDNAのファージベクターへの組み込みとin vitroパッケージング

15μlのcDNA溶液に、EcoRI及びNot Iで消化後、脱リン酸化処理したλgt11D（Pharmacia-LKB社）2μgを加え、エタノール沈殿後、8μlのリガーゼ緩衝液に溶解した。1/75希釈ATP溶液1μl、T4DNAリガーゼ1μlを添加し、16℃にて30分間保温した後、氷上で冷却保存した。

【0059】GigaPack II Gold（Stratagene社）を用いて、in vitroパッケージング反応を行い、上記のリガーゼ反応産物3本から3.22×10⁶ pfuの組換え体ファージを得た。大腸菌Y1090₊を宿主として、上記ライブラリーを増幅し、6.0×10¹⁰ pfu/mlのA431ファージ・ライブラリーストックを得た。

【0060】C. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA断片の単離同定

（1）PCRによるA431ファージ・ライブラリーcDNA挿入DNA断片の増幅

6.0×10¹⁰ pfu/mlのA431ファージ・ライブラリーのストック溶液10μl（6.0×10⁸ pfu相当）をPCR反応の鋳型DNAとして、10×PCR緩衝液5μl、1.25mM4dNTPs8μl、10D/ml λgt11-forwardプライマー（λgt11F）（配列番号：17）2μl、10D/ml λgt11-reverseプライマー（λgt11R）（配列番号：18）2μl、及び5U/μl TaqDNAポリメラーゼ（Perkin Elmer Cetus社）1μlを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて50μlとし、93℃にて1分間、55℃にて2分間、72℃にて3分間の反応サイクルを30回行い、72℃にて10分間保温した。1%アガロースゲル電気泳動による解析の結果0.8～6kbに及ぶスメアーなパターンを示した。

【0061】（2）cDNA挿入DNA増幅断片混合物を鋳型としたTP7（配列番号：20；配列番号：30

15

の683~703に対応) / TP10、TP7/TP6 (配列番号: 19; 配列番号: 30の1036~1001の相補鎖に対応)、TP8 (配列番号: 21; 配列番号: 30の941~964に対応)、TP10 (配列番号: 22; 配列番号: 30の1036~986の相補鎖に対応) 及びTP8/TP6をプライマーとしたPCR解析

上記PCR反応産物1/5000希釈液1 μ lをPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 μ l、1.25mM4dNTPs8 μ l、下記のような組み合わせの10D/mlプライマー2 μ lづつ、及びPerfect Match (Stratagene社) 1 μ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 μ lとした。

【0062】95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus社) 1 μ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて2分間、72℃にて3分間の反応サイクルを30回行い、72℃にて10分間保温した。プライマーとしては、TP7/TP10、TP7/TP6、TP8/TP10及びTP8/TP6を用いた。2%アガロースゲル電気泳動による解析の結果、プライマーに対応して、それぞれ354bp、354bp、96bp及び96bpのバンドを得た。

【0063】(3) TP7/TP10及びTP7/TP6をプライマーとしたPCR増幅産物(354bp)の一次構造配列の解析

TP7/TP10及びTP7/TP6をプライマーする上記PCR増幅産物(354bp)のバンドを電気泳動後の2%アガロースゲルから切り出し、DEPC処理蒸留水50 μ lを加えて45℃にて30分間加熱した。

【0064】このDNA溶液2 μ lをPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 μ l、1.25mM4dNTPs8 μ l、下記のような組み合わせの10D/mlプライマー2 μ lづつ、Perfect Match (Stratagene社) 1 μ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 μ lとし、95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ (PerkinElmer Cetus社) 1 μ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて2分間、72℃にて3分間の反応サイクルを30回行い、72℃にて10分間保温した。

【0065】プライマーとしては、TP7/TP10及びTP7/TP6を用いた。これらPCR反応産物(それぞれ354bp)のバンドを電気泳動の2%アガロースゲルから切り出し、抽出・精製してpCRII (Invitrogen社) に挿入した後、大腸菌INV α F' (Invitrogen社) をトランスフォーメーションした。トランスフォーマントのプラスミドDNAを抽出精製し、EcoRI消化により354bpのDNA断片が挿入されていることを確認した。

16

【0066】挿入DNA断片の一次構造配列はM13 forwardプライマー (M13F) (配列番号: 23) 及びM13 reverseプライマー (M13R) (配列番号: 24) を用いて解析した (Applied Biosystems社の自動シーケンサー、モデル370A)。

【0067】その結果、配列番号: 30のヌクレオチド番号704~999に相当する296bpの配列が明らかとなり、この中には、プライマーTP7の下流に相当するアミノ酸配列番号9のC末端3アミノ酸 (XRK, DNA塩基配列からはERK)、プライマーTP6の上流に相当するアミノ酸配列番号6のN末端5アミノ酸 (ADLSG)、及びプライマーTP8に相当するアミノ酸配列番号5の8アミノ酸 (YLRLGLK) に対応する配列が存在し、このPCR反応産物(それぞれ354bp) が巨核球増殖分化因子cDNAの一部であることが明らかとなった。

【0068】3. 巨核球増殖分化因子cDNAのスクリーニング

A. 巨核球増殖分化因子発現細胞株(A431)由来のcDNAプラスミド・ライブラリーの調製

(1) ファースト・ストランドcDNAの合成
A431由来のmRNA5 μ gから、Gibco BRL社のSuperScriptプラスミドシステムを用いて、cDNAを合成した。

【0069】まず、2 μ lのNotIプライマー・アダプターを、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理蒸留水5 μ lに溶解したmRNA5 μ gに加え、70℃にて10分間加熱した後、氷上で冷却した。5xファースト・ストランド緩衝液4 μ l、0.1MDTT溶液2 μ l、10mM4dNTPs 1 μ l及びDEPC処理蒸留水1 μ lを添加し、37℃にて2分間保温した。5 μ lのSuperScript逆転写酵素を加え、37℃にて1時間保温した後、氷上に置き反応を停止した。

【0070】(2) セカンド・ストランドcDNAの合成

ファースト・ストランドcDNAの合成に用いた20 μ lの反応液のうちの18 μ lに、DEPC処理蒸留水93 μ l、5xセカンド・ストランド緩衝液30 μ l、10mM4dNTPs3 μ l、10U/ μ l E. coli DNAリガーゼ1 μ l、10U/ μ l E. coli DNAポリメラーゼ4 μ l、及び2U/ μ l E. coli RNaseH 1 μ lを添加し、16℃にて2時間保温した。2 μ l (10U) のT4DNAポリメラーゼを添加し、16℃にて5分間保温した。

【0071】反応液を氷上に置き10 μ l 0.5M EDTA及び150 μ lのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて10分間遠心し、上清140 μ lを新たな遠心チューブに移した。7.5M酢酸アンモニウム70 μ l及びエタノール0.5mlを加えて攪拌し、-80℃にて30分間放置した。14,000xgに

17

て10分間遠心し、上清を除いた後、0.5mlの70%エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥した。

【0072】(3) BstXIアダプターの付加
上記のcDNA沈殿を25μlのDEPC処理蒸留水に溶解し、5xT4DNAリガーゼ緩衝液10μl、BstXIアダプター (Invitrogen社) 10μl及びT4DNAリガーゼ5μlを添加し、16℃にて16時間保温した。50μlのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて5分間遠心し、上清45μlを新たな遠心チューブに移した。7.5M酢酸アンモニウム25μl及びエタノール150μlを加えて攪拌し、-80℃にて30分間放置した。14,000xgにて10分間遠心し、上清を除いた後、0.5mlの70%エタノールで沈殿を洗浄し、減圧下で乾燥した。

【0073】(4) NotI消化
上記のcDNA沈殿を41μlのDEPC処理蒸留水に溶解し、REAct7緩衝液5μl、NotI 4μlを添加し、37℃にて2時間保温した。50μlのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて10分間遠心し、上清45μlを新たな遠心チューブに移した。

(5) アダプターの除去と部分的cDNAのサイズ分画
上記のcDNA溶液をQuick Spin Column Linker 5 (Boehringer Mannheim 社) を用いて分画した。40μg/μlのcDNAが50μl得られた。

【0074】(6) cDNAのファージベクターへの組み込みと大腸菌のトランスフォーメーション
上記のcDNA溶液37.5μlに、NotI及びBstXI消化したpRC/CMV (Invitrogen社) ベクター (29μg/μl) を12.5μl加え、Takara LigationキットA液400μl及びB液50μlを添加し、16℃にて30分間保温した。Max Efficiency DH5αコンピテントセル (Gibco BRL 社) 1mlを用いてトランスフォーメーションを行い、71,550コロニーの組換え体を得た。プレートから全コロニーを集菌し (2.86×10⁷ 細胞/ml)、20%グリセロール存在下で-80℃にて保存した。

【0075】B. コロニー・ハイブリダイゼーションによる巨核球増殖分化因子cDNAのスクリーニング
A431由来のcDNAプラスミド・ライブラリーを用いて、9cmプレート60枚に合計22.7万個 (プレート当たり3700個) のコロニーをニトロセルロースフィルターに写し取った。プローブは、NI067と3'-RACE adaptor (Gibco BRL 社) をプライマーとする900bpのPCR産物 (前述) のBamHI消化による2つのDNA断片 (0.5kb及び0.4kb) を [α-³²P] dCTPを用いたニックトランスレーションにより調製した。

【0076】コロニー・ハイブリダイゼーションにおい

18

ては、フィルターを5xSSC、25mMリン酸緩衝液 (pH7.4)、5xDenhardt Solution、1%SDS、100μg/ml熱変性鮭精子DNA及び50%ホルムアミド中で42℃にて18時間保温し、5xSSC、0.1%SDS中で40℃にて20分間、45℃にて20分間洗浄した。検出はBAS2000 (Fujiフィルム) を用いて18時間露光にて行った。

【0077】三次スクリーニングまで行い、TP290、TP308、TP310、及びTP317の4種のクローンを得た。挿入cDNAの長さは、それぞれ1.2kb、1.1kb、1.2kb及び1.2kbであった。TP290、TP310、及びTP317は配列番号:30のヌクレオチド番号685より下流の領域をカバーすることが明らかとなった。

【0078】4. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析 (3)

A. 巨核球増殖分化因子発現細胞株 (HPC-Y11) 由来) のmRNAの調製

ヒト膀胱癌細胞株 (HPC-Y11) の凍結細胞1.1gから、Pharmacia-LKB 社のRNA抽出キット及びmRNA精製キットを用いて、50μgのmRNAを抽出・精製した。

【0079】B. 巨核球増殖分化因子発現細胞株 (HPC-Y11) 由来のcDNAファージ・ライブラリーの調製

(1) cDNAの合成

HPC-Y11由来のmRNA 5μgから、Pharmacia-LKB 社のTimeSaver cDNA合成キットを用いて、cDNAを合成した。まず、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理蒸留水20μlに溶解したmRNA 5μgを65℃にて10分間加熱した後、氷上で冷却した。ファースト・ストランド反応混合液11μl、DTT溶液1μl、Directional Cloning Toolbox (Pharmacia LKB 社) 添付のNotI/オリゴマ (dT) 18プライマー溶液1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。

【0080】セカンド・ストランド反応混合液100μlを添加し、12℃にて30分間、22℃にて1時間保温した後、65℃にて10分間加熱した。100μlのフェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール (25:24:1、以下PCと略す) を加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセファクリルS-400スピンカラム (Pharmacia-LKB 社) を用いて分画し、100μlのcDNA溶液を得た。

【0081】(2) EcoRIアダプターの付加

100μlのcDNA溶液にEcoRIアダプター (Pharmacia-LKB 社) 5μl、ポリエチレングリコール30μl、ATP溶液1μl及びT4DNAリガーゼ1μlを添加し、37℃にて1時間保温した。65℃にて10分間加熱した後、ATP溶液1.5μl、T4ポリヌク

レオチドキナーゼ1 μ lを添加し、37℃にて30分間保温した。65℃にて10分間加熱した後、Not I 2 μ lを添加し、37℃にて1時間保温した。150 μ lのPCを加えて、激しく攪拌した後、14,000xgにて1分間遠心し、上清をセファクリルS-400スピナラムを用いて分画し、150 μ lのcDNA溶液を得た。

【0082】(3) cDNAのファージベクターへの組み込みとin vitroパッケージング

15 μ lのcDNA溶液に、EcoRI及びNot Iで10消化後、脱リン酸化処理した λ gt11D (Pharmacia-LKB社) 2 μ gを加え、エタノール沈殿後、8 μ lのリガーゼ緩衝液に溶解した。1/75希釈ATP溶液1 μ l、T4DNAリガーゼ1 μ lを添加し、16℃にて30分間保温した後、氷上で冷却保存した。GigaPack II Gold (Stratagene社)を用いて、in vitroパッケージング反応を行い、上記のリガーゼ反応産物3本から5.34 $\times 10^5$ pfuの組換え体ファージを得た。大腸菌Y1090_rを宿主として、上記ライブラリーを増幅し、1.7 $\times 10^{11}$ pfu/mlのHPC-Y 20 11ファージ・ライブラリーストックを得た。

【0083】C. PCRによる巨核球増殖分化因子全長cDNA 5'側断片の単離同定

(1) PCRによるHPC-Y11ファージ・ライブラリーcDNA挿入DNA断片プライマーNI074上流領域部分の増幅

1.7 $\times 10^{11}$ pfu/mlのHPC-Y11ファージ・ライブラリーストック溶液1 μ l (1.7 $\times 10^5$ pfu相当)をPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 μ l、1.25mM4dNTPs 8 μ l、100 30 D/ml λ gt11-forward F1プライマー(配列番号:25) 1 μ l、50D/ml NI074プライマー1 μ l及びPerfect Match (Stratagene社) 1 μ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 μ lとした。

【0084】95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus社) 1 μ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて2分間の反応サイクルを35回行い、72℃にて10分間保温した。2%ア 40 ガロースゲル電気泳動による解析の結果0.3~6kbに及ぶスミアなパターンを示した。

【0085】(2) λ gt11F1/NI074をプライマーとしたPCR増幅断片混合物を鋳型とした λ gt11F2(配列番号:26)/NI075、 λ gt11F2/TP12(配列番号:28;配列番号:30の703~683の相補鎖に対応)、 λ gt11F2/TP11(配列番号:27;配列番号:30の619~599の相補鎖に対応)、 λ gt11F2/TP13(配列番号:29;配列番号:30の595~575の相補鎖 50

に対応)、TP7/NI074、TP7/NI075及びNI073/NI074をプライマーとしたPCR解析

【0086】上記PCR反応産物1/100希釈液1 μ lをPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 μ l、1.25mM4dNTPs 8 μ l、下記のような組み合わせの100D/mlプライマー0.5 μ lづつ、及びPerfect Match (Stratagene社) 1 μ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 μ lとし、95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus社) 1 μ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて2分間、72℃にて2分間の反応サイクルを35回行い、72℃にて10分間保温した。

【0087】プライマーとしては、 λ gt11F2/NI075、 λ gt11F2/TP12、 λ gt11F2/TP11、 λ gt11F2/TP13、TP7/NI074、TP7/NI075、及びNI073/NI074を用いた。2%アガロースゲル電気泳動による解析の結果、プライマーに対応して、それぞれ969bp、870bp、786bp、762bp、330bp、120bp、及び149bpのバンドを得た。

【0088】(3) F2/NI075をプライマーとしたPCR増幅産物(969bp)の λ gt11F/TP11及び λ gt11F/TP13をプライマーとしたPCR解析とその一次構造配列の解析

λ gt11F2/NI075をプライマーとする上記PCR反応産物(969bp)の0.5 μ lをPCR反応の鋳型DNAとして、10xPCR緩衝液5 μ l、1.25mM4dNTPs 8 μ l、100D/ml λ gt11Fプライマー1 μ l、100D/ml TP11プライマー1 μ l又は100D/ml TP13プライマー1 μ l、及びPerfect Match (Stratagene社) 1 μ lを添加して、総量をDEPC処理蒸留水にて49 μ lとした。

【0089】95℃にて5分間、60℃にて5分間加熱した後、5U/ μ l Taq DNAポリメラーゼ (Perkin Elmer Cetus社) 1 μ lを添加して、94℃にて1分間、60℃にて2分間、72℃にて2分間の反応サイクルを35回行い、72℃にて10分間保温した。

【0090】PCR反応産物(それぞれ678bp、654bp)のバンドを電気泳動後の2%アガロースゲルから切り出し、抽出・精製してpCRII (Invitrogen社)に挿入した後、大腸菌INV α F' (Invitrogen社)をトランスフォーメーションした。トランスフォーマントのプラスミドDNAを抽出精製し、EcoRI消化により0.7kbのDNA断片が挿入されていることを確認した。挿入DNA断片の一次構造配列はM13 forwardプライマーM13F及びM13 reverseプライマーM13Rを用いて解析した (Applied Biosystems社

の自動シーケンサー、モデル370A)。

【0091】その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号1～619に相当する619bpの配列が明らかとなり、配列番号：30のヌクレオチド番号487から619までの133ヌクレオチドの配列は、実施例2、1で明らかになった一次構造配列のN末端側に一致した。この619bpの配列の中には、アミノ酸配列番号：3の19アミノ酸(DNA塩基配列からはVERVDFTNHLEDTRRNINK)、アミノ酸配列番号：7の5アミノ酸(LYDAK)に対応する配列が存在し、このPCR反応産物(それぞれ0.7kb)が巨核球増殖分化因子cDNAの一部であることが明らかとなった。

【0092】翻訳開始メチオニンはヌクレオチド74番目と考えられ、5'非翻訳領域は73bpであった。従って、このPCR反応産物(それぞれ0.7kb)が巨核球増殖分化因子の構造遺伝子のN末端を含むことが明らかとなった。

【0093】5. PCRによる巨核球増殖分化因子cDNA塩基配列の解析(4)

本項4. C(3)より得られたHPC-Y11由来巨核球増殖分化因子の構造遺伝子のN末端及び、5'非翻訳領域と考えられる配列のうち5'非翻訳領域と考えられる部分の配列である配列番号：30のヌクレオチド番号12～31の配列よりオリゴマーNI083(配列番号：31)を合成した。

【0094】本項1.で調製したA431細胞のポリAを有するRNAを用い、Preamplification System(Gibco BRL)を用い、添付のオリゴマーであるランダム・ヘキサマーを用い添付の操作指示書にしたがってfirst strand cDNAを合成し、NI083とNI074を用いAmpliTaq(宝酒造)にてPCRを行った。その結果、巨核球増殖分化因子cDNA断片である1001塩基対のDNA断片を得た。

【0095】この1001塩基対のPCR産物であるDNA断片をそのまま反応基質として用い、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing キット(アプライドバイオシステムズ社)と蛍光塩基配列決定装置(アプライドバイオシステムズ社370A型機)を採用し、添付の操作指示書にしたがって本項1と同様、直鎖塩基配列決定法により塩基配列を決定した。その結果、配列番号：30のヌクレオチド番号32より486の配列を明らかにした。また、配列番号：30のヌクレオチド番号487より991の配列について得られた結果は、本項1.で得られた配列と一致した。

【0096】本項1.で得られた配列と合わせA431細胞の巨核球増殖分化因子cDNAの塩基配列である配列番号：30のヌクレオチド番号32より1950の配列が明らかになった。この配列について、アミノ酸翻訳への全ての場合である3つの読み枠について機械的にア

ミノ酸配列に翻訳を行った。その内のひとつの読み枠の中に、配列番号：1～9のアミノ酸配列全てが存在する連続してアミノ酸配列に翻訳が可能な領域を持つものを見いだし、巨核球増殖分化因子の読み枠を明らかにした。

【0097】この読み枠で、翻訳開始部位に見いだされるメチオニンのコード(配列番号：30のヌクレオチド番号74より76)が存在し、ここより配列番号：1～9のアミノ酸配列が存在する連続してアミノ酸配列に翻訳が可能な領域が配列番号：30のヌクレオチド番号1213まで続くことを見だし、配列番号：30のヌクレオチド番号74より1213までが、巨核球増殖分化因子に翻訳される部分であることを明らかにした。

【0098】配列番号：30のヌクレオチド番号74より76のメチオニンのコードは、M. Kozakによって見いだされた翻訳開始部位に高頻度に見いだされるメチオニンのコードと周辺の配列(5'NNATGG)(Nucleic Acids Research(1981)Vol.9 P.5233-5252)にたいしGCAATGG(配列番号：30のヌクレオチド番号71より77)と適合した。

【0099】巨核球増殖分化因子の一次構造配列が明らかになり、構造遺伝子のアミノ酸残基数は380、推定分子量は42904.43、推定等電点が6.79であった。アミノ酸配列配列番号：1が、配列番号：30のアミノ酸番号188より196に、アミノ酸配列配列番号：2が、配列番号：30のアミノ酸番号181より187に、アミノ酸配列配列番号：3が、配列番号：30のアミノ酸番号126より144に、アミノ酸配列配列番号：4が、配列番号：30のアミノ酸番号325より341に、

【0100】アミノ酸配列配列番号：5が、配列番号：30のアミノ酸番号289より297に、アミノ酸配列配列番号：6が、配列番号：30のアミノ酸番号305より324に、アミノ酸配列配列番号：7が、配列番号：30のアミノ酸番号121より125に、アミノ酸配列配列番号：8が、配列番号：30のアミノ酸番号284より288に、アミノ酸配列配列番号：9が、配列番号：30のアミノ酸番号204より213に対応していた。さらに、ポリA付加シグナルであるAATAAA配列が、配列番号：30のヌクレオチド番号1933より1938に存在した。

【0101】実施例3. A431細胞からのPCRによる巨核球増殖因子cDNAの単離同定と発現ベクターの作製

実施例2によって得られた配列(配列番号：30)よりオリゴマーNI078(配列番号：32)とNI079(配列番号：33)を合成した。なお、NI078では、翻訳開始メチオニンコードを含むヌクレオチド番号13から37が、配列番号：30のヌクレオチド番号74より98の配列と一致し、人工的に、EcoRI認識

23

部位(ヌクレオチド番号4から9)とNruI認識部位(ヌクレオチド番号8から13)を付加してあり、そしてNI079では、ヌクレオチド番号17から49が、配列番号:30のヌクレオチド番号1237より1269の相補鎖の配列と一致し、人工的に、EcoRI認識部位(ヌクレオチド番号3から8)とNotI認識部位(ヌクレオチド番号9から16)を付加してある。

【0102】実施例3の項1.で調製したA431細胞のポリAを有するRNAを用い、Pre amplification System (Gibco BRL)を用い、添付のオリゴマーであるランダムヘキサマーを用い添付の操作指示書にしたがって第一鎖cDNAを合成し、NI078とNI079を用いAmpliTaq (Perkin Elmer Cetus社)にてPCRを行った。その結果、巨核球増殖分化因子cDNA断片であり巨核球増殖分化因子蛋白質の情報の全てを有する、1224塩基対のDNA断片を得た。

【0103】このDNA断片をEcoRIで処理し、オリゴマーNI078(配列番号:32)とNI079(配列番号:33)に人工的に付加してあるEcoRI認識部位を利用し、巨核球増殖分化因子cDNA断片の両端にEcoRI接着部位を生じさせた。この巨核球増殖分化因子cDNA断片をほ乳類細胞系における発現ベクターpdkCR-DHFRの導入部位である、EcoRI認識部位に導入した。

【0104】動物細胞発現ベクターpdkCR-DHFR (Oikawa, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 164, 39, 1989)はpKCR (O' Hare, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527, 1981)の誘導体でSV40の初期プロモーター、ラビットβ-グロビン、dhfr (dehydrofolate reductase)遺伝子を有する。尚、この発現ベクターにより形質転換された宿主細胞は、Escherichia coli SBM 308と命名されて、工業技術院微生物工業技術研究所に平成2年6月7日に微工研菌寄第11506号(FERMP-11506)として寄託され、そして1993年2月18日にFERM BP-4197としてブダペスト条約に基づく国際寄託に移管された。

【0105】得られた発現ベクターのpdkCR-DHFRに組み込まれた巨核球増殖分化因子cDNAを含むクローンpdkCR-DHFR-TPO55についてもTaq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencingキット(アプライドバイオシステム社)と蛍光塩基配列決定装置(アプライドバイオシステム社370A型機)を採用し、添付の操作指示書にしたがって決定した。その結果、配列番号:30のヌクレオチド番号99より1236の配列およびオリゴマーNI078とNI079の配列と一致した。またベクターに導入された巨核球増殖分化因子cDNAが発現用プロモーターに対して、順方向であることも塩

24

基配列の決定によって確認した。

【0106】本項の実施例により示されるように、配列番号:30のヌクレオチド配列の情報のみあれば、任意の巨核球増殖分化因子発現細胞(たとえばA431細胞)より、巨核球増殖分化因子cDNAの全て、及び任意の部分を増幅し、塩基配列を決定すること、さらに、任意の発現ベクターにクローン化することは、同業者にとって容易である。

【0107】実施例4. 巨核球増殖分化因子の発現

10 (1) カイコ発現系ベクターの構築

巨核球増殖分化因子cDNAクローンpdkCR-DHFR-TPO55をNotIで消化し、NI079に人工的に付加してあるNotI認識部位で切断した。これによって生じたNotI接着末端を宝酒造(株)のプランティングキットを用い、平滑化し、この平滑末端に、XbaIリンカー(宝酒造(株))を添付の操作指示書にしたがって導入した。

【0108】このようにして得られたプラスミドをNruIとXbaIで同時に消化し、NI078に人工的に付加してあるNruI認識部位と、導入したXbaIリンカーのXbaI認識部位とで切断し、NruI接着末端とXbaI接着末端を持つ巨核球増殖分化因子cDNA断片を作製した。この断片を、カイコ多角体ウイルス用バキュロウイルス転移ベクターであるpBm4(蚕糸・昆虫農業技術研究所より入手可能)をNruIとXbaIで同時に消化しpBm4の遺伝子導入部位であるNruI認識部位に導入し、pBm4-TPO55を得た。

30 【0109】(2) 巨核球増殖分化因子組み換えウイルスの作製

カイコ胚由来細胞株Bomol5AIIc(蚕糸・昆虫農業技術研究所より入手可能)はMGM448に10%ウシ胎児血清(FBS:Gibco BRL)と抗生物質としてゲンタマイシン(500μg/ml)を加えた培地で25℃にて継代培養を行った。巨核球増殖分化因子組み換えウイルスはカイコ多核体ウイルス遺伝子DNAとpBm4-TPO55プラスミドDNAをカイコ培養細胞にたとえばリン酸カルシウム共沈法などで同時に導入することによって作製した。

【0110】野生型ウイルスP6E株(蚕糸・昆虫農業技術研究所より入手可能)のゲノムDNA2μgとトランスファープラスミドpBm4-TPO55 10μgを240μlの滅菌精製水に溶解し、等量の0.5M CaCl₂, 0.1M HEPESを加え混合し10分間室温で放置した後、この混合液に0.2M NaCl, 0.05M HEPES, 0.75mM NaH₂PO₄, 0.75mM Na₂HPO₄を加え、数秒攪拌後、室温で20-30分間放置することにより、ゲノムDNAとプラスミドを含むリン酸カルシウムゲルを形成させた。

25

【0111】次にこの様にして得られたウイルス遺伝子DNAとトランスファーベクターを含むリン酸カルシウムゲル混液(サスペンション)960 μ lを前日に25cm²のTフラスコ(T25, Corning)中のMGM448(10%FBS、抗生物質を含む)4mlにまき直したBomol5AIIc細胞へ加え、12時間放置した。新たなMGM448(10%FBS、抗生物質を含む)に培地を交換し25℃にて培養した。培養6日目に培地を回収しウイルス原液とした。

【0112】その培養液を遠心して清澄化した上清を希釈して平面に培養したBomol5AIIc細胞の培養基に添加して8日間培養後、顕微鏡観察によりウイルス感染が見られ、かつ多角体が形成していない培養基を選択した(限界希釈法)。このウイルス液のなかに野生型のウイルスの混入は認められなかった。ここで作製した巨核球増殖分化因子をコードするDNAを含む組み換え体ウイルスをTPO55-BmNPVとした。

【0113】(3) 組み換え体ウイルス液の調製
25cm²のフラスコ底面で約1 \times 10⁶細胞のBomol5AIIc細胞を4mlの10%FBSを含むMGM448培地中で2日間平面培養した培養基に前記(2)項でクローニングした組み換え体ウイルスを含むBomol5AIIc細胞の培養液10 μ lをBomol5AIIc細胞に添加して、25℃で14日間培養後、培養液を1000rpmで5分間遠心分離して、遠心上清を組み換え体ウイルス液として得た。

【0114】(4) 組み換え体巨核球増殖分化因子の発現の検証

25cm²のフラスコ底面で約1 \times 10⁶細胞のBomol5AIIc細胞を4mlの10%FBSを含むMGM448培地中で2日間平面培養した培養基に前記で得られた組み換え体ウイルス液あるいは野生型ウイルスを感染多重度0.5になるようにBomol5AIIc細胞に添加して、25℃で3日間培養した。感染細胞及び非感染細胞よりIsogen(和光純薬)をもちいて全RNAを回収した。

【0115】この全RNA 1 μ gを、アガロース電気泳動に付し、大きさによる分画を行った後、Zetaprobeメンブレン(Bio-Rad)に毛細管現象によって移した。このメンブレンを、digoxigenin(ペーリンガーマンハイム)で標識した巨核球増殖分化因子cDNA(実施例2.1.で得られたN2065とKY100によるPCR産物;配列番号:30のヌクレオチド番号449-1255の配列)(巨核球増殖分化因子プローブDNA)を含むハイブリダイゼーションバッファー中に浸し、42℃で12時間保温することにより、組み換え体巨核球増殖分化因子mRNAと巨核球増殖分化因子プローブDNAの特異的複合体を形成させた。

【0116】この複合体にアルカリホスファターゼを結

26

合させた抗digoxigenin抗体(ペーリンガーマンハイム)を反応させた後、AMPPD(ペーリンガーマンハイム)のアルカリホスファターゼによる分解時に生ずる化学蛍光発光によって組み換え体巨核球増殖分化因子mRNAを検出した。図11に示すごとく、TPO55-BmNPV感染細胞の全RNAに組み換え体巨核球増殖分化因子mRNAが検出され、この感染細胞内で巨核球増殖分化因子mRNAが発現していることが示された。

【0117】(5) カイコ体液の調製

5令のカイコ幼虫に、本項(2)で得た組み換え体ウイルスのウイルス液と比較対照として、野生型ウイルスB6E株を10⁻¹希釈し50 μ l/頭注射し、26℃で4~5日間、市販の人工飼育(モース:片倉工業製)を与えて飼育後、50頭のカイコの腹部を切り、体液及び中腸内物などを含む抽出液を氷冷したプラスチックチューブに採取し、遠心分離の上清を得た。

【0118】(6) 巨核球増殖分化因子の活性確認

本項(5)で得たカイコ体液50mlを20mM Tris/HCl(pH7.4)緩衝液に対して充分透析し、同一緩衝液で平衡化したMatrex BlueAカラム(Φ 2.5 \times 15cm)にて分画し組換え体ウイルス、野生型ウイルスを注射したカイコ体液中の活性を比較した。結合蛋白質の溶出は、非結合画分を充分に洗浄後0~1MのNaClの濃度勾配を形成させることにより行った。図12に示すごとく、組換えウイルス液を注射した体液中の巨核球誘導活性は野生型ウイルスを注射した体液由来の活性よりも明らかに高値を示した。

【0119】本明細書に開示された方法は、カイコバキュロウイルス転移ベクターpBm4、カイコ多角体ウイルスP6E株、カイコ細胞Bomol5AIIc細胞に限定されるものではない。例えば、その他のバキュロウイルス転移ベクター(例えばpBK283, pBKblue;以上フナコシ(株)より入手可能)、カイコ多角体ウイルス(精製されたDNAとしてフナコシ(株)より入手可能)、カイコ細胞(BmN4細胞;フナコシ(株)より入手可能)を用いてこれと同等の生理活性物質を得ることは当業者にとって容易である。

【0120】

【発明の効果】A431細胞培養上清より新規の巨核球増殖分化因子を精製し、その性質及び部分アミノ酸構造を決定した。今回精製した最終標品はIL-3の存在下で骨髓細胞から巨核球の産生を促進することが認められた。本因子は巨核球の増殖分化過程で重要な調節機能を果たしており、in vivoでも血小板増多因子として働くものである。従って本因子は臨床で大きな問題のある、血小板の減少を伴う各種造血疾患に対してのみならず骨髓移植時の放射線照射によって減少する血小板数のコントロール、がんの化学療法時における血小板数のコントロールなどに対しても有効な治療薬と成りうる。

(15)

特開平6-313000

27

【0121】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Xxx Glu Thr Ile Asn Xxx His Phe Lys

1 5 9

【0122】配列番号：2

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

配列：

Val Glu Xxx Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Xxx Xxx

1 5 10 15

Asn Ile Asn Lys

19

【0124】配列番号：4

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

配列：

Xxx Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Xxx Ala Ala

1 5 10 15

Xxx Gly

17

【0125】配列番号：5

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Xxx Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys

1 5 9

【0126】配列番号：6

配列：

Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser

1 5 10 15

Arg Met Xxx Gly Lys

20

【0127】配列番号：7

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Leu Tyr Asp Ala Lys

1 5

【0128】配列番号：8

28

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Xxx Glu Xxx Ala Phe Thr Lys

1 5 7

【0123】配列番号：3

配列の長さ：19

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：ペプチド

*

20※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

★配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

30 トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Asn Tyr Glu Met Lys

1 5

【0129】配列番号：9

50 配列の長さ：10

29

30

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ala Val Ala Met Met His Gln Xxx Arg Lys

1

5

10

【0130】配列番号：10

配列の長さ：38

配列：

GTIGARIIG TIGAYTTYAC IAAYCAYTI GARGAYAC

【0131】配列番号：11

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列：

TACATCGAIG TIACIGARGA RGGIACNGAR GC

【0132】配列番号：12

配列の長さ：37

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

配列：

GGCCACGCGT CGACTAGTAC TTTTTTTTTT TTTTTT

【0133】配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列：

ATGTTGTGGG GACTGCTATA

【0134】配列番号：14

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列：

CAAGGCGAAT GACCTCTAAG TAT

【0135】配列番号：15

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CCCCGAAGCA ATCCCAGAGA G

【0136】配列番号：16

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

CTCAGGCAGC AGAACGTACA T

【0137】配列番号：17

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列：

GGCGACCACT CCTGGAGCCC G

【0138】配列番号：18

配列の長さ：22

配列の型：核酸

*配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：配列番号3のアミノ酸配列に翻訳対応。I
はイノシン

*

※トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：配列番号4のアミノ酸配列に翻訳対応。I
はイノシン

※

★トポロジー：直鎖

配列の種類：合成DNA

配列の特徴：3'-RACE Kit (Gibco B

★20 RL) 添付のオリゴマー

☆鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

☆ 配列の種類：合成DNA

◆鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

◆30 配列の種類：合成DNA

*鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

* 配列の種類：合成DNA

※鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

※40 配列の種類：合成DNA

★鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

★ 配列の種類：合成DNA

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖

50 配列の種類：合成DNA

(17)

31		32
配列:		
GACACCAGAC CAACTGGTAA TG		22
【0139】配列番号: 19	* 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 36	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	* 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAAT		36
【0140】配列番号: 20	※ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	※10 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
GCTGTGGCCA TGATGCACCA G		21
【0141】配列番号: 21	★ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 24	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	★ 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
TACCTGCGGG CCTGGGCCT GAAG		24
【0142】配列番号: 22	☆ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 51	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	☆20 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAATGCCA GACAGGTCAG C		51
【0143】配列番号: 23	◆ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	◆ 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
GTTTCCAG TCACGAC		17
【0144】配列番号: 24	* 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 17	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	*30 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
CAGGAAACAG CTATGAC		17
【0145】配列番号: 25	※ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 20	トポロジー: 直鎖	
配列の特徴: 核酸	※ 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
AATTATGGCC CACACCAGTG		20
【0146】配列番号: 26	★ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 20	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	★40 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
ACTAGCCGCT ACAGTCAACA		20
【0147】配列番号: 27	☆ 鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	☆ 配列の種類: 合成DNA	
配列:		
TTGCCACTTG CCTTTGAAGT A		21
【0148】配列番号: 28	鎖の数: 1本鎖	
配列の長さ: 21	トポロジー: 直鎖	
配列の型: 核酸	50 配列の種類: 合成DNA	

33

34

配列:

CTGATGCATC ATGGCGACTG C

21

【0149】配列番号: 29

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

* 鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

* 配列の種類: 合成DNA

配列:

AGCATTACCC AGCACCATT A C

21

【0150】配列番号: 30

配列の長さ: 1950

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖

配列の種類: complementary DNA (cD

NA)

起源 生物名: ヒト (A431細胞)

10 配列の特徴: ヒト巨核球増殖分化因子をコードするDN A

配列:

【0151】

GGCAGGAGAG GAACTGAAGC CCAGCTGTGA AGGCCGAGAG CTGCAGTGAG 50

AGGAGGCTGC ACTCCATTTT GCA ATG GCC TCC CTT GCT GCA GCA AAT 97

Met Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asn

1

5

GCA GAG TTT TGC TTC AAC CTG TTC AGA GAG ATG GAT GAC AAT CAA 142

Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln

10

15

20

GGA AAT GGA AAT GTG TTC TTT TCC TCT CTG AGC CTC TTC GCT GCC 187

Gly Asn Gly Asn Val Phe Phe Ser Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala

25

30

35

CTG GCC CTG GTC CGC TTG GGC GCT CAA GAT GAC TCC CTC TCT CAG 232

Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly Ala Gln Asp Asp Ser Leu Ser Gln

40

45

50

ATT GAT AAG TTG CTT CAT GTT AAC ACT GCC TCA GGA TAT GGA AAC 277

Ile Asp Lys Leu Leu His Val Asn Thr Ala Ser Gly Tyr Gly Asn

55

60

65

TCT TCT AAT AGT CAG TCA GGG CTC CAG TCT CAA CTG AAA AGA GTT 322

Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu Lys Arg Val

70

75

80

TTT TCT GAT ATA AAT GCA TCC CAC AAG GAT TAT GAT CTC AGC ATT 367

Phe Ser Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu Ser Ile

85

90

95

GTG AAT GGG CTT TTT GCT GAA AAA GTG TAT GGC TTT CAT AAG GAC 412

Val Asn Gly Leu Phe Ala Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys Asp

100

105

110

TAC ATT GAG TGT GCC GAA AAA TTA TAC GAT GCC AAA GTG GAG CGA 457

Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg

115

120

125

GTT GAC TTT ACG AAT CAT TTA GAA GAC ACT AGA CGT AAT ATT AAT 502

Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Arg Arg Asn Ile Asn

130

135

140

AAG TGG GTT GAA AAT GAA ACA CAT GGC AAA ATC AAG AAC GTG ATT 547

Lys Trp Val Glu Asn Glu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile

145

150

155

GGT GAA GGT GGC ATA AGC TCA TCT GCT GTA ATG GTG CTG GTG AAT 592

Gly Glu Gly Gly Ile Ser Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn

160

165

170

35	36
GCT GTG TAC TTC AAA GGC AAG TGG CAA TCA GCC TTC ACC AAG AGC	637
Ala Val Tyr Phe Lys Gly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser	
175 180 185	
GAA ACC ATA AAT TGC CAT TTC AAA TCT CCC AAG TGC TCT GGG AAG	682
Glu Thr Ile Asn Cys His Phe Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys	
190 195 200	
GCA GTC GCC ATG ATG CAT CAG GAA CGG AAG TTC AAT TTG TCT GTT	727
Ala Val Ala Met Met His Gln Glu Arg Lys Phe Asn Leu Ser Val	
205 210 215	
ATT GAG GAC CCA TCA ATG AAG ATT CTT GAG CTC AGA TAC AAT GGT	772
Ile Glu Asp Pro Ser Met Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly	
220 225 230	
GGC ATA AAC ATG TAC GTT CTG CTG CCT GAG AAT GAC CTC TCT GAA	817
Gly Ile Asn Met Tyr Val Leu Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu	
235 240 245	
ATT GAA AAC AAA CTG ACC TTT CAG AAT CTA ATG GAA TGG ACC AAT	862
Ile Glu Asn Lys Leu Thr Phe Gln Asn Leu Met Glu Trp Thr Asn	
250 255 260	
CCA AGG CGA ATG ACC TCT AAG TAT GTT GAG GTA TTT TTT CCT CAG	907
Pro Arg Arg Met Thr Ser Lys Tyr Val Glu Val Phe Phe Pro Gln	
265 270 275	
TTC AAG ATA GAG AAG AAT TAT GAA ATG AAA CAA TAT TTG AGA GCC	952
Phe Lys Ile Glu Lys Asn Tyr Glu Met Lys Gln Tyr Leu Arg Ala	
280 285 290	
CTA GGG CTG AAA GAT ATC TTT GAT GAA TCC AAA GCA GAT CTC TCT	997
Leu Gly Leu Lys Asp Ile Phe Asp Glu Ser Lys Ala Asp Leu Ser	
295 300 305	
GGG ATT GCT TCG GGG GGT CGT CTG TAT ATA TCA AGG ATG ATG CAC	1042
Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser Arg Met Met His	
310 315 320	
AAA TCT TAC ATA GAG GTC ACT GAG GAG GGC ACC GAG GCT ACT GCT	1087
Lys Ser Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Thr Ala	
325 330 335	
GCC ACA GGA AGT AAT ATT GTA GAA AAG CAA CTC CCT CAG TCC ACG	1132
Ala Thr Gly Ser Asn Ile Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr	
340 345 350	
CTG TTT AGA GCT GAC CAC CCA TTC CTA TTT GTT ATC AGG AAG GAT	1177
Leu Phe Arg Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp	
355 360 365	
GAC ATC ATC TTA TTC AGT GGC AAA GTT TCT TGC CCT TGA	1216
Asp Ile Ile Leu Phe Ser Gly Lys Val Ser Cys Pro ...	
370 375 380	
AAATCCAATT GGTTTCTGTT ATAGCAGTCC CCACAACATC AAAGAACCAC	1266
CACAAGTCAA TAGATTGAG TTTAATTGGA AAAATGTGGT GTTTCCTTTG	1316
AGTTTATTTT TTTCTAACAT TGGTCAGCAG ATGACACTGG TGACTTGACC	1366
CTTCCTAGAC ACCTGGTTGA TTGTCCTGAT CCCTGCTCTT AGCAITCTAC	1416
CACCATGTGT CTCACCCATT TCTAATTCA TTGCTTTTCT TCCCACGCTC	1466
ATTTCATCA TTCTCCCCCA TGACCCGTCT GGAAATTATG GAGAGTGCTC	1516
AAC TGGAAG GAGAACGTAG AAGTAGCCCT AGGGATCCTT TTTGAACTC	1566
TACAGTTATC GCAGATATTC TAGCTTCATT GTAAGCAATC TAGGAAATAA	1616

37

GCCCTGCTGC TTTCTAGAAA TAAGTGTGAA GGATAAAITTT TCTTTGTTGA
 CCTATGAAGA TTTTAGAGTT TACCITCATA TGTITGATTT TAAATCAGTG
 TATAATCTAG ATGGTAAAAA ATGTGAAATT GGGATTAGGG ACCAACCAAA
 ATATTTTCATT AATGCTTTCA ATTGACAAAT TTTGGTCTTT CTTTGATAAG
 ACAATATGTA CATAGTTTTT TCAAAATATTA AAGATCTTTT AACTGTTGGC
 AGTTGTTATC TACAGAATCA TATCTCATAT GCTGTGTAGT TTATAAGTTT
 TTTCTCTATT TATCAGAATA AAGAAATACA ACAT

38

1666
 1716
 1766
 1816
 1866
 1916
 1950

【0152】配列番号: 31

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 1本鎖

* トポロジー: 直鎖

配列の種類: 合成DNA

10 起源 生物名: ヒト

* 配列の特徴: 5' 非翻訳領域

配列:

AACTGAAGCC CAGCTGTGAA

20

【0153】配列番号: 32

配列の長さ: 37

配列の型: 核酸

※鎖の数: 1本鎖

トポロジー: 直鎖

※ 配列の種類: 合成DNA

配列:

CTCGAATTCG CGATGGCCTC CCTTGCTGCA GCAAAATG

37

【0154】配列番号: 33

配列の長さ: 49

配列の型: 核酸

★鎖の数: 1本鎖

20 トポロジー: 直鎖

★ 配列の種類: 合成DNA

配列:

GGGAATTCGC GGGCGCGTGG TGGTTCTTTG ATGTTGTGGG GACTGCTAT

49

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はQ-セファロースによる分画の過程を示す。溶出はNaCl (0→1.0 M) の濃度勾配をフラクション1より120まで形成させることで行った。

黒丸実線; 蛋白質の溶出パターン

白丸点線; アセチルコリンエステラーゼ活性

【図2】図2はフェニル-セファロースによる分画の過程を示す。溶出は硫酸 (30%→0%)、エチレングリコール (0→50%) の濃度勾配形成をフラクション1より100まで行い、フラクション100から120までは50%エチレングリコールで行った。

黒丸実線; 蛋白質の溶出パターン

白丸点線; アセチルコリンエステラーゼ活性

【図3】図3はS-セファロースによる分画の過程を示す。溶出はNaCl (0→0.5 M) の濃度勾配をフラクション1より100まで形成させることで行った。

黒丸実線; 蛋白質の溶出パターン

白丸点線; アセチルコリンエステラーゼ活性

【図4】図4はハイロード26/60スーパーデックス75による分画の過程および各画分を示す電気泳動図を示す。

上図実線; 蛋白質の溶出パターン

白丸実線; アセチルコリンエステラーゼ活性

下図; 各画分のSDS-PAGEによる分析結果

【図5】図5は精製した巨核球増殖分化因子のSDS-PAGEによる分析の結果を示す電気泳動図である。

【図6】図6は精製した巨核球増殖分化因子の等電点電

気泳動による分析の結果を示す等電点電気泳動図である。

【図7】図7は精製した巨核球増殖分化因子のSDS-PAGE電気泳動による糖鎖分析の結果を示す電気泳動図である。

1. 無処理の巨核球増殖分化因子

2. エンドグリコシダーゼFで処理した巨核球増殖分化因子 (35 kDa 付近のバンドは酵素由来のものである)

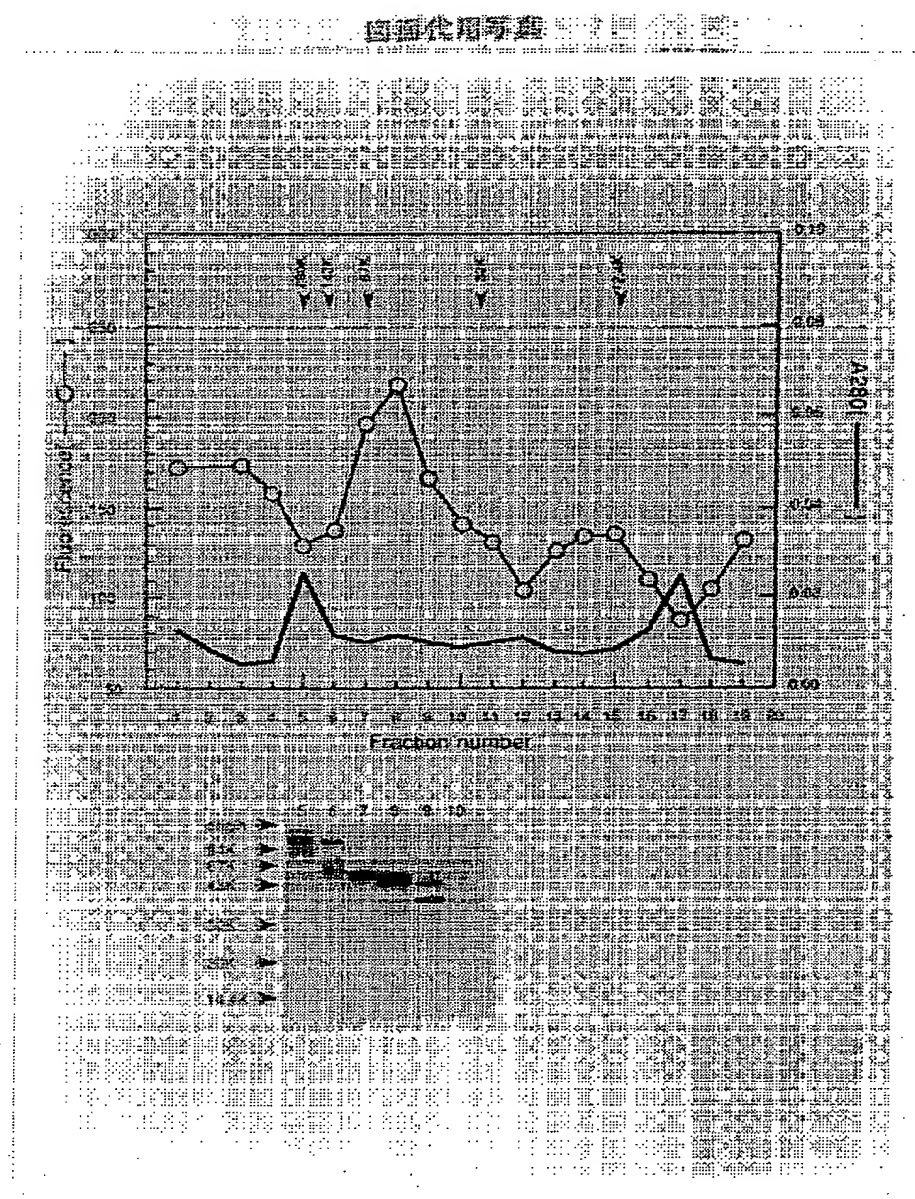
【図8】図8は、精製した巨核球増殖分化因子 (55 kDa 蛋白質) の存在下又は非存在下で、且つIL-3の添加又は無添加のもとでマウス骨髄細胞を5日間培養した場合の巨核球のアセチルコリンエステラーゼ活性を比較したグラフである。

【図9】図9は、精製した巨核球増殖分化因子の存在下 (B) 又は非存在下 (A) で、IL-3の添加後4日間培養したマウス骨髄細胞をアセチルコリンエステラーゼ染色した結果を示し、生物の形態を表わす図面に代る写真である。

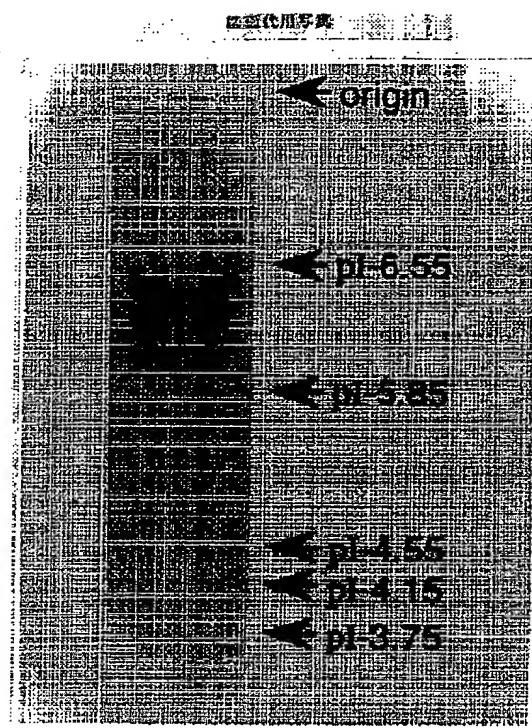
【図10】図10は、精製した巨核球増殖分化因子の存在下 (B) 又は非存在下 (A) で、IL-3の添加後4日間培養したマウス骨髄細胞をメイ=グリンワルド=ギムザ染色した結果を示し、生物の形態を表わす図面に代る写真である。

【図11】図11は、巨核球増殖分化因子をコードする遺伝子を含む組換え型ウイルス (TPO55-BmNPV) を感染させたカイコ細胞 (レーンB)、野生型ウイルス (B6E) を感染させたカイコ細胞 (レーン

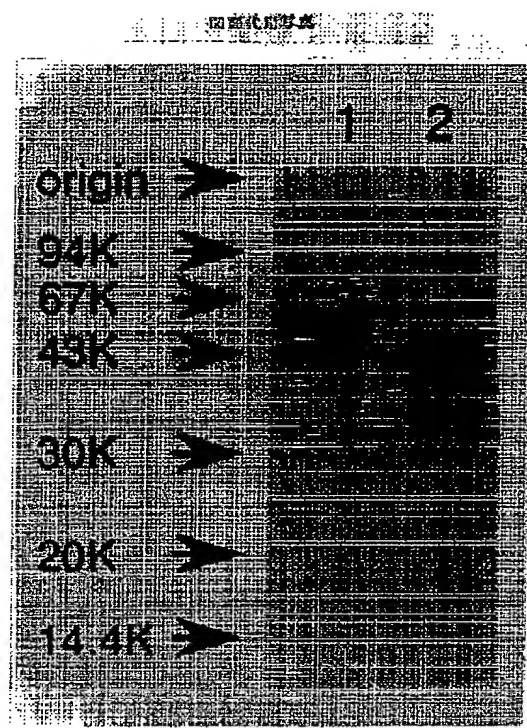
【図4】



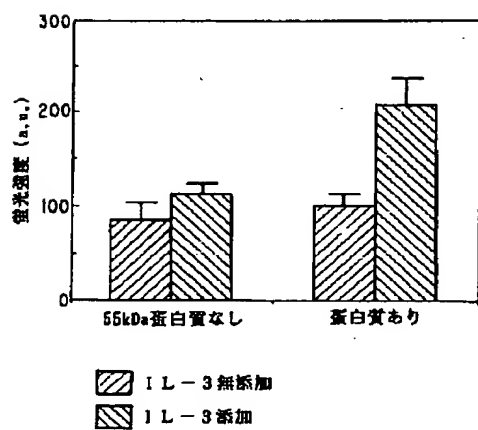
【図6】



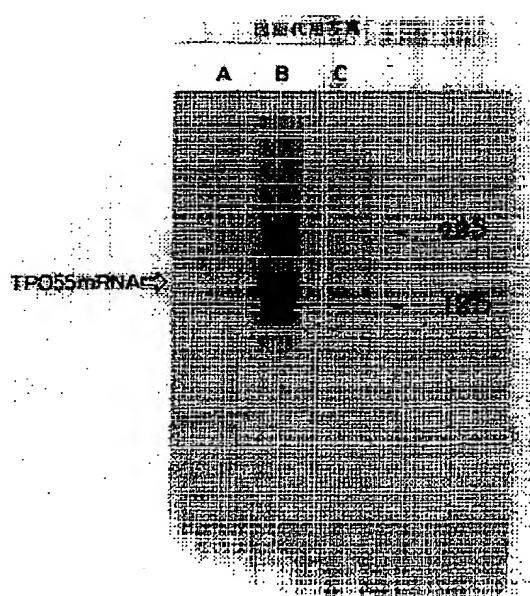
【図7】



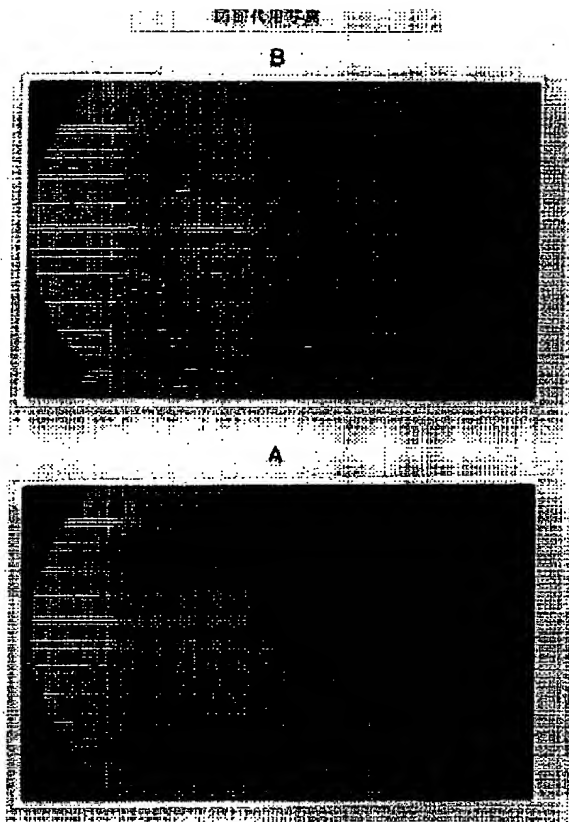
【図8】



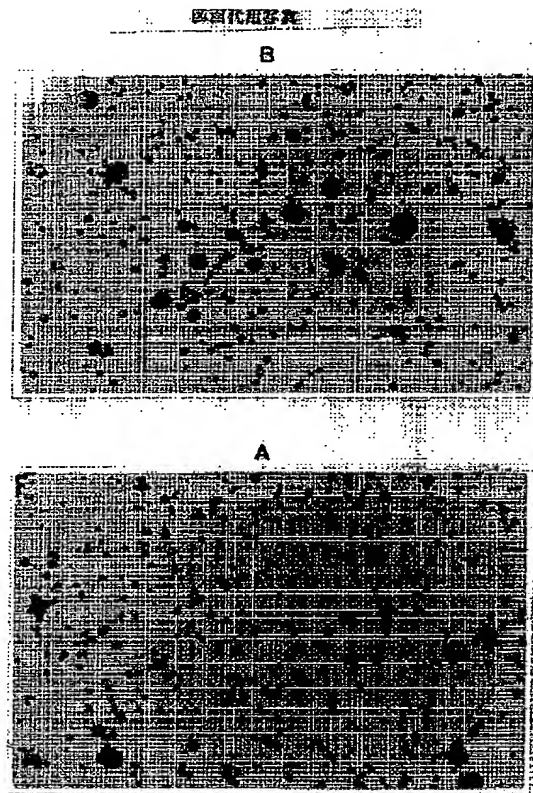
【図11】



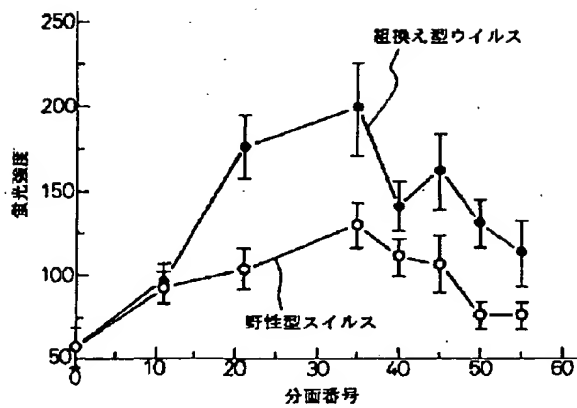
【図9】



【図10】



【図12】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁵

C 1 2 N 15/19

C 1 2 P 21/02

//(C 1 2 P 21/02

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

H 8214-4B

C12R 1:91)

(72)発明者 岩佐 冬樹
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内
(72)発明者 中里 欽
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内
(72)発明者 山市 浩造
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内

(72)発明者 三浦 健寿
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内
(72)発明者 鶴岡 伸夫
大阪府三島郡島本町若山台1丁目1番1号
サントリー株式会社生物医学研究所内
(72)発明者 山口 希
京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル
新御堂口町285-79

MENU

SEARCH

INDEX

DETAIL

JAPANESE

1 / 1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-313000

(43)Date of publication of application : 08.11.1994

(51)Int.Cl.

C07K 15/14
 A61K 37/02
 C12N 5/10
 C12N 15/19
 C12P 21/02
 //(C12P 21/02
 C12R 1:91)

(21)Application number : 05-197752

(71)Applicant : SUNTORY LTD

(22)Date of filing : 16.07.1993

(72)Inventor : TSUJIMOTO MASAFUMI
 KURIHARA TATSUYA
 ISHIDA NOBUHIRO
 IWASA FUYUKI
 NAKAZATO HIROSHI
 YAMAICHI HIROZO
 MIURA TAKEHISA
 TSURUOKA NOBUO
 YAMAGUCHI MARE

(30)Priority

Priority number : 04212305
 05 67339

Priority date : 17.07.1992
 04.03.1993

Priority country : JP

JP

(54) MEGAKARYOCYTE-PROLIFERATING AND DIFFERENTIATING FACTOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a megakaryocyte proliferating and differentiating factor capable of promoting proliferation and maturation and differentiation of a megakaryocyte, having a specific molecular weight, isoelectric point and an amino acid sequence, useful as a factor for promoting megakaryocyte-platelet-based hematopoiesis and useful for treating various diseases accompanied by decrease of platelet.

CONSTITUTION: A frozen and stored strain SBM 330 derived from a human epidermal cancer cell A431 acclimatized in a non-protein medium is thawed and then, put in a medium containing 10% fetal calf serum and cultured at 37° C in the presence of 5% CO2 until the cell becomes

Xxx Glu Thr Ile Asn Xxx His Phe Lys
 1 5 9

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] ; which promotes the proliferation and the mature specialization of a megakaryocyte proliferation differentiator: (1) megakaryocyte which have the following property.

(2); in which gel filtration and the molecular weight by analysis of SDS-PAGE show 55-57kD to, and do not have a disulfide bond between molecules.

(3) It has at least one array among the amino acid sequences shown in; and (4) array numbers 1-9 which show the isoelectric point 6.5**0.5.

[Claim 2] The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 1 produced by the human cell.

[Claim 3] The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 2 produced by the human-cancer cell.

[Claim 4] The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 3 produced by the cell of the Hominoidea epidermoid-carcinoma cell A431 origin.

[Claim 5] The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 4 produced by the cell of the Hominoidea epidermoid-carcinoma cell A431 origin proliferated in the protein free medium.

[Claim 6] the same amino acid sequence as a megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 1, or its part -- a deletion or the replaced amino acid sequence -- or -- this -- the megakaryocyte proliferation differentiator obtained from the culture of the transformed cell by which the same amino acid sequence or its part has the amino acid sequence by which the amino acid of 1 - plurality was added to the deletion or the replaced amino acid sequence, and was developed with gene modification technology

[Claim 7] Array number: The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 6 in which the amino acid sequence shown in 30 or its part has the amino acid sequence to which the amino acid of 1 - plurality was added for the deletion, the replaced amino acid sequence, this amino acid sequence, or the part at the deletion or the replaced amino acid sequence.

[Claim 8] The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 6 or 7 which a sugar chain combines.

[Claim 9] A megakaryocyte proliferation differentiator given in any 1 term of claims 6-8 with which N terminus is embellished biochemically or chemically.

[Claim 10] The megakaryocyte proliferation differentiator according to claim 9 by which the methionine of initiation is removed and the alanine following it is acetylated.

[Claim 11] A megakaryocyte proliferation differentiator given in any 1 term of the claims 6-10 obtained from the culture of the transformed cell developed by gene modification technology using the polynucleotide which carries out the code of at least one of the amino acid sequences shown in the array numbers 1-9, and the polynucleotide to hybridize.

[Claim 12] The gene which carries out the code of the amino acid sequence of the megakaryocyte proliferation differentiator of a publication to any 1 term of claims 1-11.

[Claim 13] The expression vector which changes including a gene according to claim 12.

[Claim 14] The host as for whom the transformation was done by the expression vector according to claim 13.

[Claim 15] The physic constituent which contains the megakaryocyte proliferation differentiator of a publication as an active principle in any 1 term of claims 1-11.

[Claim 16] The physic constituent according to claim 15 which is a thrombocytopenia therapeutic drug.

[Claim 17] The antibody which uses a megakaryocyte proliferation differentiator given in any 1 term of claims 1-11 as an antigen.

[Claim 18] The manufacture method of the megakaryocyte proliferation differentiator which cultivates or breeds a host according to claim 14, and is characterized by extracting a megakaryocyte proliferation differentiator.

[Translation done.]

* NOTICES *

Japan Patent Office is not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] this invention relates to the gene which carries out the code of a megakaryocyte proliferation differentiator and it. It is related with the still more useful megakaryocyte proliferation differentiator as a promoter of megakaryocyte-platelet system hemopoiesis in a detail, its manufacture method, and its use.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is a well-known fact that the various hematogenous factors to which various blood cells guide the proliferation and specialization in process in which it results in a mature corpuscle, from a hematopoietic stem cell involve. Although the life of a platelet is as short as nine - ten days at Homo sapiens, the platelet concentration in blood is maintained at simultaneously regularity in the steady state. Moreover, even if it decreases a platelet by various methods in a laboratory animal, recovery of a platelet count is accepted into blood within several days. Many efforts are ** crack ***** from the former for it being assumed that the factor which promotes production of a platelet from these things at a thrombocytopenia term exists, and identifying the factor.

[0003] It is thought that at least two kinds of regulators participate in formation of the megakaryocyte which is the precursor cell of a platelet in megakaryocyte platelet system hemopoiesis. The 1st factor forms a megakaryocyte colony independently and is called megakaryocyte colony stimulating factor. Although there is no activity in which a megakaryocyte colony is made to form if the 2nd factor is independent, if the former is made to live together, the colony count of a megakaryocyte will be increased, or it has the operation which promotes the proliferation specialization, and is called a megakaryocyte amplifier.

[0004] As a thing belonging to the former, interleukin 3, and a granulocyte / macrophage colony stimulating factor are known, and erythro POECHIN, a macrophage colony stimulating factor, interleukin 6, 7, and 11, LIF, etc. are known as the latter. Moreover, in these factors, it is actually in. There are some in which effects, such as an increase in a platelet count and shortening of a recovery stage, are accepted in vivo (Hideaki Mizoguchi : protein nucleic-acid enzyme 361195 ' 91).

[0005] However, many of these factors show very various biological activity, such as participating not only in proliferation and specialization of a megakaryocyte / platelet system but in specialization of the corpuscle of each system. For example, in IL-6 and IL-11, it is actually in. Although there is an increase operation of the platelet in vivo, production of an acute stage protein is urged, or in being remarkable, it starts a cachexia. Moreover, in the case of IL-6, there are also many troubles on clinical application -- there is possibility of proliferating the mesangial cell of a kidney and starting renal failure -- (Matsuda positive protein nucleic-acid enzyme 36 1184 ' : 91). Moreover, IL-6 do not show a high price in blood at a thrombocytopenia term, and it is not considered a physiological factor.

[0006] The platelet has played the important role in mechanism of hemostasis. The disorders (a Fanconi syndrome, megakaryocyte nature thrombocytopenia, hypoplastic anemia, etc.) accompanied by a thrombocytopenia are dangerous disorders clinically, and when it bleeds

especially, they will be in the state where it becomes impossible to control it. Therefore, it is thought that it will probably be useful to carry out isolation identification of the factor which promotes production of a platelet when avoiding such risk.

[0007] Moreover, although a bone marrow transplantation is becoming leading cures, such as leukemia, in recent years, the success percentage is rising by use of cytokines, such as EPO and G-CSF. The present trouble is a thrombocytopenia, and if the increase factor is obtained, success percentage rises further and is expected to be also able to shorten a hospitalization period. It is controllable by the thrombocytosis factor not only to a hematogenous disorder but the thrombocytopenia at the time of a canceration study treatment or radiotherapy.

[0008]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] As a result of repeating research wholeheartedly, this invention persons found out the new factor which promotes proliferation and mature specialization of a megakaryocyte, did cloning of the gene which carries out the code of this factor, produced the expression vector which has this gene further and resulted in completion of this invention to find out the factor which promotes production of a platelet effective in a thrombocytopenia or the disorder accompanied by the depression of a platelet in view of the trouble which the above-mentioned known factor has.

[0009]

[Means for Solving the Problem] That is, this invention promotes the proliferation and the mature specialization of a megakaryocyte proliferation differentiator:(1) megakaryocyte which have the following property.;

(2) Gel filtration and the molecular weight by analysis of SDS-PAGE show 55-57kD, and do not have a disulfide bond between molecules.;

(3) It is related with; which has at least one array among the amino acid sequences shown in; and

(4) array numbers 1-9 which show the isoelectric point 6.5 ± 0.5 .

[0010] as the generation raw material of the megakaryocyte proliferation differentiator of this invention -- a human cell, for example, a human-cancer cell, -- the Hominoidea epidermoid-carcinoma cell A431 and the cell of the Hominoidea epidermoid-carcinoma cell A431 origin proliferated especially preferably in the protein free medium are raised preferably moreover, the amino acid sequence as the above-mentioned megakaryocyte proliferation differentiator with the same this invention or its part -- a deletion or the replaced amino acid sequence -- or -- this -- the same amino acid sequence or its part has the amino acid sequence by which the amino acid sequence of 1 - plurality was added to the deletion or the replaced amino acid sequence, and is related also with the megakaryocyte proliferation differentiator obtained from the culture of the transformed cell developed by gene modification technology

[0011] Furthermore, an array number: The amino acid sequence shown in 30 or its part is related with the megakaryocyte proliferation differentiator in which a deletion, the replaced amino acid sequence, this amino acid sequence, or its part has the amino acid sequence by which the amino acid of 1 - plurality was added to the deletion or the replaced amino acid sequence. this invention relates to the gene which carries out the code of the aforementioned megakaryocyte growth factor further. this invention relates also to the manufacture method of the megakaryocyte growth factor by the gene modification technology which uses this gene further.

[0012] The same amino acid sequence as the above-mentioned megakaryocyte proliferation differentiator or its part gene modification technology A deletion or the replaced amino acid sequence, or -- this -- that the same amino acid sequence or its part should just perform the amino acid sequence by which the amino acid sequence of 1 - plurality was added to the deletion or the replaced amino acid sequence according to known technique using the composition or the natural polynucleotide which carries out a code, although not limited especially Regulation of manifestation efficiency etc. can be aimed at by improvement of addition of a signal sequence, improvement, suitable selection of the host-vector system, and gene expression control-section grade etc. Moreover, you may obtain as that with which the sugar chain was combined by a host's selection. Furthermore, you may use the polynucleotide which carries out the code of at least one of the amino acid sequences shown in the array numbers 1-9 as a DNA probe for gene cloning, this invention offers the physic constituent which contains

this megakaryocyte proliferation differentiator as an active principle further again, and is preferably used as a thrombocytopenia therapeutic drug. Moreover, if this megakaryocyte proliferation differentiator is used, a specific antibody can also be obtained by well-known technique.

[0013]

[Specific Explanation]

(1) Use the culture supernatant of the cell of the Hominoidea epidermoid-carcinoma cell A431 (ATCC CRL 1555) origin whose proliferation was attained for example, in the non-protein culture medium as a generation raw material of the new protein of a material this invention by Yamaguchi's and others method (Yamaguchi, N et al., Cancer Res.50 7008 '91). this cell -- Human epidermoid Carcinoma It is named SBM330 and ****s to the Agency of Industrial Science and Technology microorganism engineering lab as Fermentation Research Institute **** No. (FERM BP-3911) 3911 on July 1, 1992.

[0014] (2) Carry out the activity measurement of an acetylcholineesterase by which being able to use a megakaryocyte system cell strain (for example, a CMK cell and the cell of it the origin), the mouse marrow cell, etc., for example, being specifically detected in the megakaryocyte of a rodent using the mouse marrow cell is known to measurement of the proliferation differentiator of the measuring method megakaryocyte of a megakaryocyte proliferation differentiator by Ishibashi's and others method (Ishibashi, T. et al. Proc.Natl.Acad.Sci USA 86 5953 '89).

Moreover, histochemistry-detection of a megakaryocyte is performed by judging the configuration of the cell dyed in the marrow cell by performing after [cultivation] acetylcholineesterase dyeing, and May = GURYUN world = GIMUZA dyeing.

[0015] (3) Refining of the refining megakaryocyte proliferation differentiator of a megakaryocyte proliferation differentiator makes start material the non-protein culture supernatant of for example, A431 cell, and is after concentration and a column chromatography, for example, Matrex, by ultrafiltration. BlueA (Amicon), Q-sepharose (Pharmacia Corp.), phenyl-sepharose (Pharmacia Corp.), S-sepharose (Pharmacia Corp.), high loading 26/60 It can carry out combining each column chromatography of Superdex 75(Pharmacia Corp.) ** one by one. It acts as the monitor of the protein by measuring A280 nm.

[0016] (4) Determination of the partial amino acid sequence of a megakaryocyte proliferation differentiator : in order to know the structure of an amino acid sequence, add a protease (for example, achromobacter ProteaseI (API)), 37 degrees C, process the megakaryocyte proliferation differentiator fraction refined by (3) for 2 hours, and fragmentation-ize it. It is the obtained peptide fragment YMC-Pack It isolates preparatively by the antiphase HPLC by AM-303 column (bottom acetonitrile inclination formation of 0.1% trifluoroacetic-acid existence). It is a sequencer, for example, Applied, about the obtained peptide fragment. It applies to the gas-phase sequencer made from Biosystem, and an amino acid sequence is determined. The concrete refining method of the above-mentioned megakaryocyte proliferation differentiator and a detailed property are indicated in the example 1.

[0017] this invention offers the gene which carries out the code of the above-mentioned megakaryocyte proliferation differentiator again. This gene may be any of cDNA from mRNA, genomic DNA, and Chemosynthesis DNA. Cloning of the cDNA can be carried out by the polymerase-chain-reaction method (PCR) using the DNA (nucleotide) primer designed based on the partial amino acid sequence as shown in the example 1 of the megakaryocyte proliferation differentiator refined from the human cell, for example, a Hominoidea epidermoid-carcinoma cell, for example, A431 cell strain, as was the above. One concrete example of cloning is shown in an example 2.

[0018] The gene of this invention carries out the code of the protein or glycoprotein which has megakaryocyte proliferation differentiator activity further, and the nucleotide sequence of array number:30 and DNA to hybridize are also contained. The amino acid sequence presumed from the nucleotide sequence and this nucleotide sequence of DNA by which cloning was carried out in the example 2, and which carry out the code of the megakaryocyte growth factor of this invention is shown in array number:30.

[0019] In this way, the polypeptide which the amino acid of 1 - plurality will be added to this

natural amino acid sequence, and will, in addition, maintain megakaryocyte growth factor activity once an amino acid sequence is determined, The polypeptide which the amino acid of 1 – plurality is removed from the aforementioned natural amino acid sequence, and is, in addition, maintaining megakaryocyte growth factor activity, The polypeptide and further which the amino acid of 1 in the aforementioned natural amino acid sequence – plurality is replaced by other amino acid, and are, in addition, maintaining megakaryocyte growth factor activity Various variant megakaryocyte growth factors, such as a polypeptide which has the variation with which amino acid addition variation, an above-mentioned amino acid removal variation, and above-mentioned amino-acid-substitution variation were combined, and is, in addition, maintaining megakaryocyte growth factor activity, can be designed, and it can be manufactured.

[0020] The number of the amino acid in variation, such as addition of the above-mentioned amino acid, removal, and substitution The number of the amino acid of the functional protein used for hybrid protein with the megakaryocyte proliferation differentiator of this invention about addition, for example although not limited especially for example, well-known extraction refining of a maltose binding protein (maltose-binding protein) etc., the protein for stabilization, or various physiological activity proteins -- For example, depending on it of the transit peptide added to IL-3, a cytokine like IL-11, or this factor, it is determined depending on the purpose of the variation concerned. 1-30 -- addition of 1-10 is raised preferably [for example,]

[0021] moreover, about removal, it designs and the number of the amino acid removed is determined that megakaryocyte proliferation activity is maintained -- having -- 1-30 -- the number of the amino acid of fields other than 1-20, and the active region of this factor is raised preferably [for example,] furthermore, about substitution, it designs and the number of the amino acid replaced is determined that megakaryocyte proliferation activity is maintained -- having -- 1-10 -- 1-5 are raised preferably [for example,]

[0022] In this invention, although the nucleotide sequence shown in array number:30 as a nucleotide sequence of the gene which carries out the code of the megakaryocyte proliferation differentiator is indicated, the gene of the megakaryocyte proliferation differentiator of this invention is not limited to this. Once the amino acid sequence of a natural megakaryocyte proliferation differentiator is determined or the amino acid sequence of a variant megakaryocyte proliferation differentiator is designed, based on the degeneracy of a codon, the various nucleotide sequences which carry out the code of the same amino acid sequence can be designed, and it can be prepared. In this case, it is desirable to use the codon used by high frequency by the host who should use it.

[0023] Although cDNA can be obtained as it indicates in the example 2 in order to obtain the gene which carries out the code of the natural megakaryocyte proliferation differentiator of this invention, it is not limited to this. That is, cloning of the gene which will carry out the code of the natural megakaryocyte proliferation differentiator if one nucleotide sequence which carries out the code of the amino acid sequence of a natural megakaryocyte proliferation differentiator is determined can be carried out to this invention as cDNA by different strategy from the strategy indicated concretely, and it can also carry out cloning from the genome of a cell which produces it further.

[0024] When carrying out cloning from a genome, various primer nucleotides or probe nucleotides which were used in the example 2 can be used as a probe because of selection of a genomic DNA fragment. Moreover, an array number: Other probes designed based on the nucleotide sequence indicated to 30 can also be used. From the genome, the general method for carrying out cloning of the DNA made into the purpose may be set in this industry, and is learned (Current Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons, Chapter 5, and Chapter 6).

[0025] The gene which carries out the code of the natural megakaryocyte proliferation differentiator of this invention can be prepared also by chemosynthesis again. In this industry, an automatic DNA synthesis machine, for example, Applied Biosystem 396DNA / RNA-synthesis machine etc., adopts and is easy for the chemosynthesis of DNA. Therefore, this contractor can compound easily DNA of a nucleotide sequence shown in array number:30.

[0026] The gene which carries out the code of the nature type megakaryocyte proliferation differentiator of this invention by different codon from a codon by birth, and the gene which

carries out the code of the variant megakaryocyte proliferation differentiator. It can also prepare by chemosynthesis like the above. Moreover, an array number: It can also obtain according to conventional methods, such as the part specification mutagenesis method (site-directed mutagenesis) for using it with a mutagenesis primer, using as mold DNA or RNA which has the nucleotide sequence shown in 30 or drawing 11-14, (for example). Current Protocols In Molecular Biology and John Wiley & Sons Refer to a shrine and an octavus chapter.

[0027] If the gene of the megakaryocyte proliferation differentiator of this invention is obtained as mentioned above, using this, it can rearrange by the method of recombining a gene for in ordinary use, and a megakaryocyte proliferation differentiator can be manufactured. That is, DNA which carries out the code of the megakaryocyte proliferation differentiator of this invention is inserted in a suitable expression vector, this expression vector is introduced into a suitable host cell, and the megakaryocyte proliferation differentiator which cultivates this host cell and targets it from the obtained culture (a cell or culture medium) is extracted. Biochemical or chemical ornamentation, for example, the amino terminus acylation etc., may be carried out, and the megakaryocyte proliferation differentiator of this invention may be obtained.

[0028] Moreover, an array number: It is based on the translation field shown in the nucleotide sequence of 30. When it searches by the fasta program (GCG package), a proteinic database a megakaryocyte proliferation differentiator belongs to the super family of the serine protease inhibitor, and it belongs to this family. The Homo sapiens leucocyte elastase inhibitor to which the distribution of the length of an amino terminus, an anticipation spacial configuration, a hydrophobic property, and a hydrophilic amino acid resembles this megakaryocyte proliferation differentiator. A fowl ovalbumin Y gene product, the Homo sapiens plasminogen activator inhibitor 2, Homo sapiens squamous cell carcinoma antigen, the amino terminus forms the transit peptide which does not receive cutting removal. An amino terminus has a function as a transit peptide, and this megakaryocyte proliferation differentiator may also be secreted in a form as it is, without being cut. Furthermore, a start methionine is desorbed from this megakaryocyte growth factor, and the alanine may be acetylated as more generally than the degree of a start methionine is an alanine stated.

[0029] A procaryote or an eukaryote can be used as a host. As a procaryote, bacteria especially *Escherichia coli* (*Escherichia coli*), and bacillus group (*Bacillus*) bacteria (*B. subtilis*), for example, *Bacillus Subtilis* etc., can be used. As an eukaryote, eukaryon nature microorganisms, such as yeast (*S. cerevisiae*), for example, *Saccharomyces* (*Saccharomyces*) group yeast, for example, *Saccharomyces cerevisiae* etc., an insect cell (*Spodoptera frugiperda*), for example, a yema cell, a cabbage looper cell (*Trichoplusia ni*), a silkworm cell (*Bombyx mori*), an animal cell, for example, a human cell, an ape cell, a mouse cell, etc. can be used. In this invention, organism itself, for example, an insect, for example, a silkworm, a cabbage looper, etc. can also be used further.

[0030] As an expression vector, a plasmid, a phage, phagemid, a virus (BAKYURO (insect), vaccinia (animal cell)), etc. can be used. The promotor in an expression vector is chosen depending on host bacteria, for example, a lac promotor, a trp promotor, etc. are used as a promotor for bacteria, and adh1 promotor, a pqr promotor, etc. are used as a promotor for yeast, for example. Moreover, as a promotor for insects, it is Simian as animal cells, such as the Baculoviridae polyhedrin promotor. early or a late promotor of Virus40 etc. is raised.

[0031] Being able to perform the transformation of the host by the expression vector by the conventional method which may set in this industry and is known, these methods are Current Protocols in Molecular Biology and John Wiley & Sons. It is indicated by the shrine. Cultivation of a transformant can also be performed according to a conventional method. According to the conventional method for isolating and refining protein, an ultrafiltration and various column chromatographies, for example, the chromatography using sepharose etc., can perform refining of the megakaryocyte multiplication differentiator from a culture.

[0032]

[Example] Next, an example explains this invention still more concretely.

Example 1. It cultivated by the initial culture medium (Ham's F12 culture medium which contains fetal calf serum 10%) after thawing the cryopreservation stock SBM 330 of A431 cell origin which carried out habituation to the cultivation non-protein culture medium of isolation refining 1]A431

cell of a megakaryocyte multiplication differentiator.

[0033] Namely, 150cm² It is 5%CO₂ at 37 degrees C until it winds a cell around ten T flasks with cultivation area and a cell becomes confluent. It cultivated under existence. Next, 850cm² after exfoliating a cell with trypsin liquid (Chiba blood serum) 0.25% Subculture was carried out to ten roller bottles with cultivation area. 37 degrees C and 0.5rpm As a result of cultivating for about three days, it is 1.8x10⁹. Cells were collected. The collected cell was made to adhere to the ceramic core (S-451) of an Opti-cell incubator (CHARUSU liver Inc., Wilmington, MA), and the circumfusion culture was started by initial culture-medium 10L.

[0034] The circumfusion culture was performed supplying the oxygen of 150mmHg(s) at 37 degrees C. Moreover, substitution from an initial culture medium to a non-protein culture medium was ****(ed) as follows. That is, the non-protein culture medium was supplied at a rate of 20 l/day after cultivation for about seven days by the initial culture medium, and culture supernatants were collected from the cultivation system at this rate. Consequently, the initial culture medium containing a blood serum was mostly transposed to the non-protein culture medium by supplying the non-protein culture medium of about 100 L. Henceforth, the cell culture supernatant liquid of 1000L was obtained by collecting cell culture supernatant liquids continuously. A part of obtained cell culture supernatant liquid (about 300L) is condensed even to 2L by the ultrafiltration membrane (Millipore, Bedford, MA;MW 10,000 cut), and it is 20 mMTris/HCl. Refining was presented with what was enough dialyzed to the buffer (pH 7.4).

[0035] 2] Measurement femaleness BDF1 of the megakaryocyte multiplication differentiator by the mouse bone marrow cell The bone marrow cell was extruded from the femur of a mouse, and it suspended in the alpha-MEM culture medium (Flow Laboratories, Inc., McLean, VA, US). Multistory [of the PARCOR (Pharmacia LKB biotechnology, Tokyo) solution with which densities differ] was carried out, and bone marrow cell suspension was carried and it carried out centrifugal by 400g for 20 minutes. Once washing the monocyte gathering in the interface of $d=1.07 / 1.08$ (g/ml) by alpha-MEM which contains FBS 10%, it re-suspended in this culture medium containing 0.5mM diisopropyl fluoro phosphate, put into the cell culture pan (Corning.Corning, NY, US) of plastics, and cultivated for 2 hours under 37 degrees C, and 5% - 95% conditions of air of carbon dioxides. The cultivation pan was changed to the new thing the middle in the 1st hour. It is a cell after cultivation 10% It washed 3 times by FBS/alpha-MEM.

[0036] Thus, it is the obtained non-adhesion bone marrow monocyte cell 10% FBS / 1% BSA/0.1mM It suspends in 2-mercaptoethanol / alpha-MEM, and is per [5x10⁴] hole in 96 hole microplate (Corning). The cell was scattered. 25U/ml mouse recombination mold IL-3 (Genzyme Corporation, Cambridge, MA, US) and 1-2microg [/ml] anti-IL-6 antibody (Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG) were added to the test sample if needed. When adding anti-IL-6 antibody, before seeding a cell, preculture of the antibody was carried out to the test sample at 37 degrees C for 1 hour.

[0037] Cultivation is 5%. CO₂-5% It carried out for four - five days at 37 degrees C under O₂-90% nitrogen existence. After washing the cell of each hole of the microplate after cultivation by PBS twice, it is 0.2% (w/v) triton of 180microl. X-100, 1mM EDTA, 0.12M 20microl Rye cis-****, next the 5.6mM iodation acetyl thio choline of a substrate were added for the cell by NaCl, 50mM HEPES, and pH7.5. It is 1 at a room temperature. After carrying out time shaking culture, the liquid of 20microl was moved from each hole to the microplate for fluorescent light measurements (Dynatech MicroFLUOR™B™Plate).

[0038] It is 0.4mM 7-diethylamino-3-(4'-maleimidylphenyl)-4-methylcoumarin of 20microl to this. in acetonitrile, 0.2% (w/v) triton of 160microl X-100, 1mMEDTA After adding 50mM Na acetate pH5.0, fluorescence emission was read in fluoro meter (excitation, 365nm, emission 450nm).

[0039] Centrifugal [of the cell] was carried out to dyeing with site spin, and it stuck on the slide glass. Acetylcholineesterase dyeing is a cell 5% According to the method (volume blood stem-cell cultivation and on Chugai Pharmaceutical medicine company (1986) Miura **** pp. 82 -88) of a fixed posterior-canal mouth, the acetyl thio choline was performed as a substrate for 15 minutes by the glutaraldehyde, 10mM phosphoric-acid buffer, and pH 6.7.

[0040] That is, it is 0.1M about the slide glass after fixation. Phosphoric-acid buffer pH 6 It washes and, next, is 1.5ml 0.67mg [/ml] iodation acetyl thio choline and 0.1M to each slide glass.

A phosphoric-acid buffer (pH 6.0), 0.2ml 30mM CuSO₄, 0.2ml 5mM potassium ferricyanide, 0.1M [0.1ml] It washed in cold water, after carrying the mixed liquor of a sodium citrate and incubating at a room temperature for 4 hours. May = GURYUN world = GIMUZA dyeing is the method of common knowledge by the hemology, and was performed in GIMUZA dyeing 10 minutes for the May = GURYUN world dyeing 4 minutes using each reagent of E. Merck Co. (Darmstadt, FRG).

[0041] 3] Carry out after [dialysis] centrifugal [of the refining A431 cell-culture supernatant-liquid concentration liquid of a megakaryocyte proliferation differentiator], and they are 20mM(s) about the supernatant liquid. Matrex which equilibrated with the Tris/HCl buffer (pH 7.4) Blue It applies to A column and is 2M NaCl after washing enough with the same buffer. The joint fraction was eluted with this included buffer. The megakaryocyte proliferation differentiator activity detected with the aforementioned measuring method was found out by the joint fraction. Then, they are 20mM(s) about this fraction. Tris/HCl It applied to Q-sepharose column which equilibrated with the same buffer after dialysis with the buffer (pH 7.4), and the megakaryocyte proliferation differentiator was made enough eluted according to the inclination after [NaCl] washing (refer to [drawing 1](#)). This factor was eluted in the NaCl 0.3 – 0.5M neighborhood.

[0042] 20mM(s) which add an equivalent for 30% saturation of ammonium sulfates to the activity fraction obtained by Q-sepharose, and contain saturated ammonium sulfate 30% Tris/HCl Buffer (pH 7.4) It applied to the phenyl sepharose column which equilibrated. The megakaryocyte proliferation differentiator was made eluted by making the concentration gradient of an ammonium sulfate (30% → 0%) and ethylene glucol (0 → 50%) form simultaneously (refer to [drawing 2](#)). The megakaryocyte proliferation differentiator activity measured under anti-IL-6 antibody existence reached far and wide in early stages of concentration-gradient formation, and was accepted.

[0043] The obtained fraction was enough applied to S-sepharose column which equilibrated with the same buffer after dialysis to 50 mM MES/NaOH buffer (pH 6.0). Elution of a joint fraction was performed by forming a concentration gradient by NaCl of 0–0.5M (refer to [drawing 3](#)). Although activity was distributed very broadly, comparatively strong activity was accepted in early stages of concentration-gradient formation. The fraction obtained by S-sepharose was serially applied to high load 26 / 60 Superdex 75 (Pharmacia) column, and the gel filtration was performed. A column is PBS beforehand. You equilibrated and made it eluted with this buffer (refer to [drawing 4](#)). Megakaryocyte proliferation differentiator activity is molecular weight 55–57kDa. It was eluted near.

[0044] It is 55–57kDa also by SDS-PAGE analysis in each above step. The fraction which shows two bands near is about 80microg in 300l. of A431 origin cell culture supernatant liquids. It was obtained. (Refer to [drawing 5](#)). These two bands showed the rise and fall of activity, and good functionality ([drawing 1](#)). Therefore, it was concluded that it was the megakaryocyte proliferation differentiator for which two bands observed by this fraction ask.

[0045] 4] The factor in the property this invention of a megakaryocyte proliferation differentiator has the following property.

1) Molecular weight : about 55 kDa(s) (drawing 4 (gel filtration and SDS-PAGE) and [drawing 5](#)) Although detected as two bands in SDS-PAGE, there is no difference of the mobility by reduction and nonreduction conditions, therefore it does not have a disulfide bond between molecules.

2) — isoelectric point: — 6.5**0.5 ([drawing 6](#))

It is detected by the range concerned as several bands.

[0046] 3) The heterogeneity of this factor shown above can be explained as heterogeneity of the sugar chain structure of a glycoprotein. That is, if this factor is processed by the endoglycosidase F which is an asparagine joint sugar chain excision enzyme, the molecular weight on SDS-PAGE of this factor is about 40 kDa(s). The fall of heterogeneity is accepted while decreasing ([drawing 7](#)). Moreover, it is API about the fraction which shows a single band on SDS-PAGE, and the fraction which shows two bands. It digests and is an antiphase. HPLC When a peptide map is produced by the fractionation to depend, a difference is not accepted in both.

4) This factor contains at least one of the amino acid sequences shown in the array numbers 1-9.

[0047] 5) If the mouse marrow cell is cultivated under the megakaryocyte proliferation differentiator by which biological activity refining was carried out, and existence of IL-3, an increase and mature specialization of the number of megakaryocytes will be observed (drawing 8 , 9 and 10). Drawing 8 is the result of measuring the megakaryocyte acetylcholineesterase activity after cultivation, and drawing 9 is the result (x20) of carrying out acetylcholineesterase dyeing of the cell after cultivation, and drawing 10 is the result (x100) of carrying out May = GURUYUN world = GIMUZA dyeing of the cell after cultivation. It turns out that the megakaryocyte is increasing from (A) under the nonexistence in (B) also in any of drawing 9 and drawing 10 under existence of a megakaryocyte proliferation differentiator.

[0048] 5] API digestion of this factor was carried out, and the structure determination of each peptide fragment was tried in order to analyze the structure of this factor in which the megakaryocyte multiplication differentiator carried out structure refining. As a result of the antiphase HPLC after API digestion recovering each ** PUCHIDO fragment and performing structure determination about a suitable fraction, each ** PUCHIDO fragment had the amino acid sequence shown in array tables 1-9.

[0049] Example 2. Analysis of the megakaryocyte multiplication differentiator cDNA base sequence by structure-determination 1. PCR of the megakaryocyte growth factor cDNA (1) the inside of an amino acid sequence -- array number: -- from 3 and 4, the gene sequence which carries out the code of the amino acid sequence was guessed, and oligomer NI065 (array number : 10; array number : 449-486 of 30 correspondence) and NI067 (array number : 11; array number : 1049-1080 of 30 correspondence) was compounded, respectively

[0050] According to the attached run book, all RNA was refined using ISOGEN (Wako Pure Chem) from A431 cell. RNA which has poly A is refined from this RNA, and it is 3'-RACE. It reacted using Kit (Gibco BRL). Above-mentioned oligomer NI065 and above-mentioned 3'-RACE Oligomer 3'RACE of Kit (Gibco BRL) appending According to the attached run book, the polymerase chain reaction (PCR) was performed using the adapter primer (array number : 12).

[0051] This reaction product is used and they are NI067 and 3'-RACE further. Oligomer 3'-RACE of Kit (GibcoBRL) appending The DNA fragment of about 900 base pairs was obtained by performing PCR again using an adapter primer. Subsequently, it is based on U.Gyllensten et al. and Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:7652 (1988). The base sequence of the portion which adopts the direct nucleotide sequence of a PCR product and directs protein, using the DNA fragment of these about 900 base pairs as a reaction substrate as it is, and its lower stream of a river Taq of an applied biotechnology systems company Dye Deoxy Terminator Cycle A Sequencing kit and fluorescence base-sequence-determination equipment (applied biotechnology systems company 370A type machine) are adopted. It determined according to the attached run book.

Consequently, an array number: The array of 1950 became clear from the nucleotide number 1081 of 30.

[0052] Oligomer KY100 (array number : 13; array number : 30 complementary strands of 1255-1236 correspondence) was compounded from this array. NI065 and 3'-RACE Oligomer 3'-RACE of Kit (Gibco BRL) appending PCR was further performed using NI065 and KY100, using the reaction product which performed PCR using the adapter primer as a reaction substrate, and the DNA fragment of 807 base pairs was obtained.

[0053] It is Taq of an applied biotechnology systems company about the base sequence, using the DNA fragment of these 807 base pairs as a reaction substrate as it is. Dye Deoxy Terminator Cycle A Sequencing kit and fluorescence base-sequence-determination equipment were adopted, and it determined according to the attached run book. Consequently, an array number: The array of 1080 became clear from the nucleotide number 487 of 30. Oligomer NI073 (array number : 14; array number : 864-886 of 30 correspondence), NI074 (array number : 15; array number : 30 complementary strands of 1012-992 correspondence), and NI075 (array number : 16; array number : 30 complementary strands of 802-782 correspondence) was compounded from this array.

[0054] 2. Analysis of Megakaryocyte Proliferation Differentiator CDNA Base Sequence by PCR

(2)

A. 1.1g of freeze cells of the manufacture Hominoidea epidermoid-carcinoma cell strain (A431) of mRNA of the megakaryocyte proliferation differentiator manifestation cell-strain (A431) origin to Pharmacia-LKB The RNA extraction kit and mRNA refining kit of a shrine were used, and mRNA of 25microg was extracted and refined.

[0055] B. mRNA5microg of the synthetic A431 origin of the manufacture (1) cDNA of the cDNA phage library of the megakaryocyte proliferation differentiator manifestation cell-strain (A431) origin to Pharmacia-LKB cDNA was compounded using the TimeSaver cDNA composition kit of a shrine. First, after heating mRNA5microg dissolved in 20micro of diethylpyrocarbonate (DEPC) processing distilled water I for 10 minutes at 65 degrees C, it cooled in Hikami. First strand reaction mixed liquor 11microl, DTT solution 1microl, Directional Cloning 130 OD(s)/ml of Toolbox (Pharmacia-LKB) appending NotI / 1micro (Pharmacia-LKB) of oligomer (dT) 18 primer solutions I was added, and it was kept warm at 37 degrees C for 1 hour.

[0056] The reactant was added into second strand reaction mixed liquor, and after keeping it warm at 22 degrees C for 30 minutes in 12 degrees C for 1 hour, it heated for 10 minutes at 65 degrees C. the phenol chloroform isoamyl alcohol (it omits 25:24:1 and Following PC) of 100microl -- in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 1 minute, fractionation of the supernatant liquid was carried out using the sephacryl S-400 spin column (Pharmacia-LKB), and the cDNA solution of 100microl was obtained

[0057] (2) It is 10 OD(s)/ml to the cDNA solution of 100micro of addition I of an EcoRI adapter. EcoRI adapter (Pharmacia-LKB) 5microl, polyethylene-glycol buffer-solution 30microl, 1/5 dilution ATP solution 1microl, and 1micro [of T4 DNA ligase] I were added, and it was kept warm at 37 degrees C for 1 hour. After heating for 10 minutes at 65 degrees C, ATP solution 1.5microl and T4 polynucleotide-kinase 1microl were added, and it was kept warm for 30 minutes at 37 degrees C. 20U/mul after heating for 10 minutes at 65 degrees C NotI2microl was added and it was kept warm at 37 degrees C for 1 hour. PC of 150microl -- in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 1 minute, fractionation of the supernatant liquid was carried out using the sephacryl S-400 spin column, and the cDNA solution of 150microl was obtained

[0058] (3) Inclusion and in to a phage vector of cDNA 11D(Pharmacia-LKB) 2micro [of lambdagt (s)] g which carried out dephosphorization processing was added to the cDNA solution of vitro packaging 15microl after digestion by EcoRI and NotI, and it dissolved in the ligase buffer solution of 8microl after ethanol precipitation. After adding 1/75 dilution ATP solution 1microl, and 1micro [of T4 DNA ligase] I and keeping it warm for 30 minutes at 16 degrees C, cooling preservation was carried out in Hikami.

[0059] GigaPackII Gold (Stratagene) is used and it is in. A vitro packaging reaction is performed and it is 3.22×10^6 pfu from the three above-mentioned ligase reaction products. The recombinant phage was obtained. The above-mentioned library was amplified by having made Escherichia coli Y1090r into the host, and 6.0×10^{10} pfu/ml A431 phage library stock was obtained.

[0060] C. Stock solution 10microl of amplification 6.0×10^{10} pfu of A431 phage library cDNA insertion DNA fragment by isolation identification (1) PCR of megakaryocyte proliferation differentiator cDNA fragment by PCR/ml A431 phage library () [6.0×10^8] pfu As template DNA of a PCR reaction, fairly 10xPCR buffer-solution 5microl, 1.25mM(s)4dNTPs8microl, 1OD/ml lambdagt11-foward primer (lambdagt 11F) (array number : 17) 2microl, 1OD/ml lambdagt11-reverse primer (lambdagt 11R) (array number : 18) 2microl and 5U/mul TaqDNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) 1microl is added. The total amount was set to 50microl with DEPC processing distilled water, for 2 minutes was performed for 1 minute and at 55 degrees C, 93 degrees C performed the reaction cycle for 3 minutes 30 times at 72 degrees C, and it was kept warm for 10 minutes at 72 degrees C. The smear pattern which attains to 0.8-6kb as a result of the analysis by 1% agarose gel electrophoresis was shown.

[0061] (2) TP7 (array number : 20; array number : 683-703 of 30 correspondence) / TP7 [TP10 and]/TP6 which used cDNA insertion DNA amplification fragment mixture as mold (array number : 19; array number : 30 complementary strands of 1036-1001 correspondence), TP8

(array number : 21; array number : 941-964 of 30 correspondence), 1micro of PCR analysis above-mentioned PCR reaction product 1 / 5000 diluents I which made the primer TP10 (array number : 22; array number : 30 complementary strands of 1036-986 correspondence), and TP8/TP6 as template DNA of a PCR reaction 10xPCR buffer-solution 5microl, 1.25mM4dNTPs8microl, 1 OD/ml primer every I [2mu] of the following combination, and PerfectMatch(Stratagene)1microl were added, and the total amount was set to 49microl with DEPC processing distilled water.

[0062] 5U/mul after heating for 5 minutes at 60 degrees C for 5 minutes in 95 degrees C Taq 1micro [of DNA polymerase] (Perkin Elmer Cetus) I was added, for 2 minutes was performed for 1 minute and at 60 degrees C, 94 degrees C performed the reaction cycle for 3 minutes 30 times at 72 degrees C, and it was kept warm for 10 minutes at 72 degrees C. As a primer, TP7/TP10, TP7/TP8 [TP6 and]/TP10, and TP8/TP6 were used. Corresponding to the primer, the band of 354bp(s), 354bp, 96bp, and 96bp(s) was obtained, respectively as a result of the analysis by 2% agarose gel electrophoresis.

[0063] (3) The band of the above-mentioned PCR amplification product (354bp) which carries out the primer of the analyses TP7/TP10 of the primary-structure array of the PCR amplification product (354bp) which made the primer TP7/TP10 and TP7/TP6, and TP7/TP6 was cut down from 2% agarose gel after electrophoresis, 50micro of DEPC processing distilled water I was added, and it heated for 30 minutes at 45 degrees C.

[0064] 2micro of this DNA solution I as template DNA of a PCR reaction 10xPCR buffer-solution 5microl, 1.25mM(s)4dNTPs8microl, the following 1 OD/ml primers every I [2mu] of combination, and PerfectMatch(Stratagene)1microl are added. 5U/mul after setting a total amount to 49microl with DEPC processing distilled water and heating for 5 minutes at 60 degrees C for 5 minutes in 95 degrees C Taq 1micro [of DNA polymerase] (PerkinElmer Cetus) I is added. For 2 minutes was performed at 60 degrees C for 1 minute, 94 degrees C performed the reaction cycle for 3 minutes 30 times at 72 degrees C, and it was kept warm for 10 minutes at 72 degrees C.

[0065] As a primer, TP7/TP10 and TP7/TP6 were used. After having cut down the band of these PCR(s) reaction product (respectively 354 bp(s)) from 2% agarose gel of electrophoresis, extracting and refining it and inserting in pCRII (Invitrogen), transformation of Escherichia coli INValphaF' (Invitrogen) was carried out. Extraction refining of the plasmid DNA of a transformant was carried out, and it checked that the DNA fragment of 354bp(s) was inserted by EcoRI digestion.

[0066] The primary-structure array of an insertion DNA fragment was analyzed using the M13foward primer (M13F) (array number : 23) and the M13reverse primer (M13R) (array number : 24) (the automatic sequencer of Applied Biosystems, model 370A).

[0067] The array of 296bp(s) equivalent to the nucleotide numbers 704-999 of 30 becomes clear. Consequently, an array number : in this The C terminus 3 amino acid of the amino-acid-sequence number 9 equivalent to the lower stream of a river of a primer TP 7 (from DNA sequence to XRK and ERK), The amino terminus 5 amino acid of the amino-acid-sequence number 6 equivalent to the upstream of a primer TP 6 (ADLSG), And the array corresponding to 8 amino acid (YLRALGLK) of the amino-acid-sequence number 5 equivalent to a primer TP 8 existed, and it became clear that this PCR reaction product (respectively 354 bp(s)) is a part of megakaryocyte multiplication differentiator cDNA.

[0068] 3. mRNA5microg to Gibco BRL of the synthetic A431 origin of manufacture (1) first strand cDNA of cDNA plasmid library of the screening A. megakaryocyte multiplication differentiator manifestation cell-strain (A431) origin of megakaryocyte multiplication differentiator cDNA cDNA was compounded using the SuperScript plasmid system of a shrine.

[0069] First, after heating the NotI primer adapter of 2microl for 10 minutes at 70 degrees C in addition to mRNA5microg dissolved in 5micro of diethylpyrocarbonate (DEPC) processing distilled water I, it cooled in Hikami. 5x first strand buffer-solution 4microl, 0.1MDTT solution 2microl, 10mM4dNTPs 1microl and 1micro of DEPC processing distilled water I were added, and it was kept warm for 2 minutes at 37 degrees C. After adding the SuperScript reverse transcriptase of 5microl and keeping it warm at 37 degrees C for 1 hour, it put on Hikami and the reaction was stopped.

[0070] (2) To 18microl of the reaction mixture of 20microl used for composition of the synthetic first strand cDNA of the second strand cDNA DEPC processing distilled water 93microl, 5x second strand buffer-solution 30microl, 10mM(s)4dNTPs3microl, 10U/mul E.coliDNA ligase 1microl, 10U/mul E.coliDNA polymerase 4microl and 2U/mul E.coli RNaseH 1microl was added and it was kept warm at 16 degrees C for 2 hours. T4 DNA polymerase of 2microl (10U) was added, and it was kept warm for 5 minutes at 16 degrees C.

[0071] reaction mixture — Hikami — placing — 10microl0.5M PC of EDTA and 150microl — in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 10 minutes, and 140micro of supernatant liquids I was moved to the new centrifugal tube 7. 5M ammonium-acetate 70microl and ethanol 0.5ml were added and stirred, and it was left for 30 minutes at -80 degrees C. After carrying out the at-long-intervals heart in 14,000xg(s) for 10 minutes and removing a supernatant liquid, precipitation was washed by 0.5ml 70% ethanol, and it dried under reduced pressure.

[0072] (3) cDNA precipitation of a BstXI adapter of the addition above was dissolved in DEPC processing distilled water of 25microl, 5xT4 DNA-ligase buffer-solution 10microl, BstXI adapter (Invitrogen) 10microl, and 5micro [of T4 DNA ligase] I were added, and it was kept warm at 16 degrees C for 16 hours. PC of 50microl — in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 5 minutes, and 45micro of supernatant liquids I was moved to the new centrifugal tube 7. 5M ammonium-acetate 25microl and ethanol 150microl were added and stirred, and it was left for 30 minutes at -80 degrees C. After carrying out the at-long-intervals heart in 14,000xg(s) for 10 minutes and removing a supernatant liquid, precipitation was washed by 0.5ml 70% ethanol, and it dried under reduced pressure.

[0073] (4) Dissolve cDNA precipitation of the NotI digestive above in DEPC processing distilled water of 41microl, and they are REAct7 buffer-solution 5microl and NotI. 4microl was added and it was kept warm at 37 degrees C for 2 hours. PC of 50microl — in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 10 minutes, and 45micro of supernatant liquids I was moved to the new centrifugal tube

(5) Fractionation of the cDNA solution of the size fractionation above of partial cDNA was carried out to removal of an adapter using QuickSpinColumnLinker5 (Boehringer Mannheim). 50microl cDNA of 40microg/ul was obtained.

[0074] (6) The pRC/CMV (Invitrogen) vector (29microg/mul) which carried out NotI(ing) and BstXI digestion was 12.5microl Added to 37.5micro of cDNA solutions I of the transformation above of the inclusion to the phage vector of cDNA, and Escherichia coli, TakaraLigation kit A liquid 400microl and 50micro of B liquid I were added, and it was kept warm for 30 minutes at 16 degrees C. Transformation was performed using MaxEfficiencyDH5alpha competent cell (Gibco BRL) 1ml, and the recombinant of 71,550 clones was obtained. The harvest of all the colonies was carried out from the plate (2.86x10⁷ cell / ml), and it saved at -80 degrees C under 20% glycerol existence.

[0075] B. the cDNA plasmid library of the screening A431 origin of the megakaryocyte proliferation differentiator cDNA by colony hybridization — using — 60 9cm plates — a total — the colony of 227,000 individual (3700 per plate) was copied to the nitrocellulose filter The probe prepared two DNA fragments (0.5kb and 0.4kb(s)) by BamHI digestion of the PCR product (above-mentioned) of 900bp(s) which make a primer NI067 and 3'-RACEadaptor (Gibco BRL) by the nick translation using [alpha-32P] dCTP.

[0076] It sets to colony hybridization and they are 5xSSC(s), 25mM phosphate buffer solution (pH 7.4), and 5xDenhardt about a filter. It moisturized at 42 degrees C for 18 hours in Solution, 1%SDS, 100microg [/ml] thermal denaturation salmon sperm DNA, and 50% formamide, and in 5xSSC and 0.1%SDS, it washed in 20 minutes at 40 degrees C, and washed for 20 minutes at 45 degrees C. Detection was performed by exposure for 18 hours using BAS2000 (Fuji film).

[0077] It carried out to the Miyoshi screening and four sorts of clones, TP290, TP308, TP310, and TP317, were obtained. The length of Insertion cDNA was 1.2kb(s), 1.1kb, 1.2kb, and 1.2kb(s), respectively. TP290, TP310, and TP317 became clear [covering a down-stream field] from the nucleotide number 685 of array number:30.

[0078] 4. Analysis of Megakaryocyte Multiplication Differentiator CDNA Base Sequence by PCR

(3)

A. 1.1g of freeze cells of the manufacture man pancreatic cancer cell strain (HPC-Y11) of mRNA of the megakaryocyte multiplication differentiator manifestation cell-strain (HPC-Y11) origin to Pharmacia-LKB The RNA extraction kit and mRNA refining kit of a shrine were used, and mRNA of 50microg was extracted and refined.

[0079] B. mRNA of the synthetic HPC-Y11 origin of the manufacture (1) cDNA of the cDNA phage library of the megakaryocyte multiplication differentiator manifestation cell-strain (HPC-Y11) origin 5microg to Pharmacia-LKB TimeSaver of a shrine cDNA was compounded using the cDNA composition kit. First, mRNA dissolved in 20micro of diethylpyrocarbonate (DEPC) processing distilled water | After heating 5microg for 10 minutes at 65 degrees C, it cooled in Hikami. First strand reaction mixed liquor 11micro, DTT solution 1micro, Directional Cloning NotI / 1micro of oligomer (dT) 18 primer solutions | of Toolbox (Pharmacia LKB) appending was added, and it was kept warm at 37 degrees C for 1 hour.

[0080] 100micro of second strand reaction mixed liquor | was added, and after keeping it warm at 22 degrees C for 30 minutes in 12 degrees C for 1 hour, it heated for 10 minutes at 65 degrees C. the phenol chloroform isoamyl alcohol (it omits 25:24:1 and Following PC) of 100micro — in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 1 minute, fractionation of the supernatant liquid was carried out using the sephacryl S-400 spin column (Pharmacia-LKB), and the cDNA solution of 100micro was obtained

[0081] (2) EcoRI adapter (Pharmacia-LKB) 5micro, polyethylene-glycol 30micro, ATP solution 1micro, and 1micro [of T4 DNA ligase] | were added in the cDNA solution of 100micro of addition | of an EcoRI adapter, and it was kept warm at 37 degrees C for 1 hour. After heating for 10 minutes at 65 degrees C, ATP solution 1.5micro and T4 polynucleotide-kinase 1micro were added, and it was kept warm for 30 minutes at 37 degrees C. After heating for 10 minutes at 65 degrees C, NotI2micro was added and it was kept warm at 37 degrees C for 1 hour. PC of 150micro — in addition, after stirring violently, the at-long-intervals heart was carried out in 14,000xg for 1 minute, fractionation of the supernatant liquid was carried out using the sephacryl S-400 spin column, and the cDNA solution of 150micro was obtained

[0082] (3) Inclusion and in to a phage vector of cDNA lambdagtIID(Pharmacia-LKB)2microg which carried out dephosphorization processing was added to the cDNA solution of vitro packaging 15micro after digestion by EcoRI and NotI, and it dissolved in the ligase buffer solution of 8micro after ethanol precipitation. After adding 1/75 dilution ATP solution 1micro, and 1micro [of T4 DNA ligase] | and keeping it warm for 30 minutes at 16 degrees C, cooling preservation was carried out in Hikami. GigaPackIIIGold (Stratagene) is used and it is in. A vitro packaging reaction is performed and it is 5.34x10⁶ pfu from the three above-mentioned ligase reaction products. The recombinant phage was obtained. The above-mentioned library was amplified by having made Escherichia coli Y1090- into the host, and the 1.7x10¹¹ pfu/ml HPC-Y11 phage library stock was obtained.

[0083] C. To PCR Isolation identification of the megakaryocyte multiplication differentiator overall-length cDNA5' side fragment to twist (1) 1micro (an equivalent for 1.7x10⁸ pfu) of amplification 1.7x10¹¹ pfu of 11 phage library cDNA insertion DNA fragment primer NI074 upstream-region portion/ml HPC-Y HPC-Y11 phage library stock solutions | by PCR As template DNA of a PCR reaction, 10xPCR buffer-solution 5micro, 1.25mM4dNTPs8micro, 100D (s)/ml lambdagt11-fowardF1 primer (array number : 25) 1micro, 5 OD/mlNI074 primer 1micro, and PerfectMatch(Stratagene)1micro were added, and the total amount was set to 49micro with DEPC processing distilled water.

[0084] 5U/mul after heating for 5 minutes at 60 degrees C for 5 minutes in 95 degrees C TaqDNA polymerase (Perkin ElmerCetus) 1micro was added, for 1 minute was performed for 1 minute and at 60 degrees C, 94 degrees C performed the reaction cycle for 2 minutes 35 times at 72 degrees C, and it was kept warm for 10 minutes at 72 degrees C. The smear pattern which attains to 0.3-6kb as a result of the analysis by 2% agarose gel electrophoresis was shown.

[0085] (2) lambdagt11F2 (array number : 26)/NI075, lambdagt11F2/TP12 (array number : 28; array number : 30 complementary strands of 703-683 correspondence) which used as mold PCR amplification fragment mixture which made the primer lambdagt11F1/NI074, lambdagt11F2/TP11

(array number : 27; array number : 30 complementary strands of 619–599 correspondence), PCR analysis which made the primer λ bdagt11F2/TP13 (array number : 29; array number : 30 complementary strands of 595–575 correspondence), TP7/TP7 [NI074 and]/NI075, and NI073/NI074 [0086] The 1micro of the PCR reaction product 1 / 100 above-mentioned diluted solutions I as template DNA of a PCR reaction 10xPCR buffer-solution 5microl,

1.25mM4dNTPs8microl, 10 OD(s)/ml primer every I [0.5mu] of the following combination, and PerfectMatch(Stratagen)1microl are added. 5U/mul after setting a total amount to 49microl with DEPC processing distilled water and heating for 5 minutes at 60 degrees C for 5 minutes in 95 degrees C TaqDNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) 1microl is added. For 2 minutes was performed at 60 degrees C for 1 minute, 94 degrees C performed the reaction cycle for 2 minutes 35 times at 72 degrees C, and it was kept warm for 10 minutes at 72 degrees C.

[0087] As a primer, λ bdagt11F2/NI075, λ bdagt11F2/TP12, λ bdagt11F2/TP11, λ bdagt11F2/TP13, TP7/TP7 [NI074 and]/NI075, and NI073/NI074 were used. Corresponding to the primer, the band of 969bp(s), 870bp, 786bp, 762bp, 330bp, 120bp, and 149bp(s) was obtained, respectively as a result of the analysis by 2% agarose gel electrophoresis.

[0088] (3) F2/NI075 0.5microl of the above-mentioned PCR reaction product (969bp) which makes a primer analysis λ bdagt11F2/NI075 of the PCR analysis which made the primer λ bdagt11 F/TP11 of a PCR amplification product (969bp) and λ bdagt11 F/TP13 which were made into the primer, and its primary-structure array As template DNA of a PCR reaction, 10xPCR buffer-solution 5microl, 1.25mM4dNTPs8microl, 10 OD(s)/ml λ bdagt11F primer 1microl, 10 OD/ml TP11 primer 1microl or 10 OD(s)/ml TP13 primer 1microl, And PerfectMatch (Stratagen)1microl was added and the total amount was set to 49microl with DEPC processing distilled water.

[0089] 5U/mul after heating for 5 minutes at 60 degrees C for 5 minutes in 95 degrees C TaqDNA polymerase (Perkin ElmerCetus) 1microl was added, for 2 minutes was performed for 1 minute and at 60 degrees C, 94 degrees C performed the reaction cycle for 2 minutes 35 times at 72 degrees C, and it was kept warm for 10 minutes at 72 degrees C.

[0090] After having cut down the band of a PCR reaction product (respectively 678 bp(s), 654 bp) from 2% agarose gel after electrophoresis, extracting and refining it and inserting in pCRII (Invitrogen), transformation of Escherichia coli INValphaF' (Invitrogen) was carried out. Extraction refining of the plasmid DNA of a transformant was carried out, and it checked that the DNA fragment of 0.7kb(s) was inserted by EcoRI digestion. The primary-structure array of an insertion DNA fragment was analyzed using M13foward primer M13F and M13reverse primer M13R (the automatic sequencer of Applied Biosystems, model 370A).

[0091] Consequently, an array number: The array of 619bp(s) equivalent to the nucleotide numbers 1–619 of 30 became clear, and the array of 133 nucleotides to the nucleotide numbers 487–619 of array number:30 was in agreement with the amino terminus side of a primary-structure array which became clear in the example 2.1. Into this array of 619bp(s), the array corresponding to 19 amino acid (from DNA sequence to VERVDFTNHLEDTRRNINK) of amino-acid-sequence number:3 and 5 amino acid (LYDAK) of amino-acid-sequence number:7 existed, and it became clear that this PCR reaction product (respectively 0.7 kb(s)) is a part of megakaryocyte multiplication differentiator cDNA.

[0092] The initiation methionine was considered to be the 74th nucleotide and 5' non-translating fields were 73bp(s). Therefore, it became clear that this PCR reaction product (respectively 0.7 kb(s)) contains the amino terminus of the structural gene of a megakaryocyte multiplication differentiator.

[0093] 5. Analysis of Megakaryocyte Multiplication Differentiator CDNA Base Sequence by PCR (4)

The amino terminus of the structural gene of the HPC-Y11 origin megakaryocyte multiplication differentiator obtained from this-paragraph 4.C (3), and the array number which is the array of the portion considered to be 5' non-translating field among the arrays considered to be 5' non-translating fields: Oligomer NI083 (array number : 31) was compounded from the array of the nucleotide numbers 12–31 of 30.

[0094] RNA which has poly A of A431 cell prepared by this paragraph 1. is used, and it is

Preamplification. Using System (Gibco BRL), an attached run book is followed using the random hexamer which is attached oligomer, and it is first. strand cDNA was compounded and PCR was performed in AmpliTaq (TAKARA SHUZO) using NI083 and NI074. Consequently, the DNA fragment of 1001 base pairs which are megakaryocyte multiplication differentiator cDNA fragments was obtained.

[0095] The DNA fragment which is the PCR product of these 1001 base pairs is used as a reaction substrate as it is, and it is Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing. A kit (applied biotechnology systems company) and fluorescence base-sequence-determination equipment (applied biotechnology systems company 370A type machine) were adopted, and the base sequence was determined by the straight chain nucleotide sequence like this paragraph 1 according to the attached run book. Consequently, an array number: The array of 486 was made clearer than the nucleotide number 32 of 30. Moreover, an array number: The result obtained about the array of 991 from the nucleotide number 487 of 30 was in agreement with the array obtained by this paragraph 1.

[0096] The array number which is the base sequence of the megakaryocyte multiplication differentiator cDNA of A431 cell together with the array obtained by this-paragraph 1.: The array of 1950 became clear from the nucleotide number 32 of 30. It translated into the amino acid sequence mechanically about three reading frames which are all the cases to an amino acid translation about this array. The thing to which all the amino acid sequences of array number:1-9 exist in one of reading frames of it and which has continuously the field which can be translated in an amino acid sequence was found out, and the reading frame of a megakaryocyte multiplication differentiator was clarified.

[0097] The thing in which the code (array number : 30 nucleotide numbers 74 76) of the methionine found out by the translation initiation site exists, and the amino acid sequence of array number:1-9 exists by this reading frame here and for which the field which can be translated follows an amino acid sequence to the nucleotide number 1213 of array number:30 continuously was found out, and even 1213 showed clearly that it is the portion translated into a megakaryocyte multiplication differentiator from the nucleotide number 74 of array number:30.

[0098] Array number: It is the code of a methionine and the surrounding array (G/A NNATGG) (Nucleic Acids Research(1981) Vol.9 P.5233-5252) which are found out by high frequency at the translation initiation site by which the code of the methionine of 76 was found out by the nucleotide number 74 of 30 by M.Kozak. It received and suited with GCAATGG (array number : 30 nucleotide numbers 71 77).

[0099] The primary-structure array of a megakaryocyte multiplication differentiator became clear, and, as for the number of amino acid residues of a structural gene, 42904.43 and the presumed isoelectric point of 380 and presumed molecular weight were 6.79. amino-acid-sequence array number: — 1 — the amino acid number 188 of array number:30 — 196 — amino-acid-sequence array number:2 — the amino acid number 181 of array number:30 — 187 — amino-acid-sequence array number:3 — the amino acid number 126 of array number:30 — 144 — amino-acid-sequence array number:4 — the amino acid number 325 of array number:30 — 341 — [0100] 5 from the amino acid number 289 of array number:30 Amino-acid-sequence array number : to 297 6 from the amino acid number 305 of array number:30 Amino-acid-sequence array number : to 324 amino-acid-sequence array number: — 7 — the amino acid number 121 of array number:30 — 125 — it corresponded to 288 from the amino acid number 284 of array number:30, and amino-acid-sequence array number:9 corresponded [amino-acid-sequence array number:8] to 213 from the amino acid number 204 of array number:30 Furthermore, the AATAAA array which is a poly A addition signal existed in 1938 from the nucleotide number 1933 of array number:30.

[0101] Oligomer NI078 (array number : 32) and NI079 (array number : 33) was compounded from the array (array number : 30) obtained according to the production example 2 of isolation identification of the megakaryocyte growth factor cDNA, and an expression vector by PCR from example 3.A431 cell. In NI078, in addition, the nucleotide numbers 13-37 containing an initiation methionine code Are in agreement with the array of 98 from the nucleotide number 74 of 30. Array number : artificially The EcoRI recognition site (nucleotide numbers 4-9) and the NruI

recognition site (nucleotide numbers 8–13) are added. in NI079 The nucleotide numbers 17–49 have added the EcoRI recognition site (nucleotide numbers 3–8) and the NotI recognition site (nucleotide numbers 9–16) artificially in accordance with the array of the complementary strand of 1269 from the nucleotide number 1237 of array number:30.

[0102] RNA which has poly A of A431 cell prepared by term 1. of an example 3 is used, and it is Preamplification. Random which is attached oligomer using System (Gibco BRL) According to the attached run book, the first chain cDNA was compounded using the hexamer, and PCR was performed in AmpliTaq (Perkin Elmer Cetus) using NI078 and NI079. Consequently, the DNA fragment of 1224 base pairs which are a megakaryocyte multiplication differentiator cDNA fragment and have all the information on megakaryocyte multiplication differentiator protein was obtained.

[0103] This DNA fragment was processed by EcoRI, the EcoRI recognition site artificially added to oligomer NI078 (array number : 32) and NI079 (array number : 33) was used, and the ends of a megakaryocyte multiplication differentiator cDNA fragment were made to produce an EcoRI cohesive site. This megakaryocyte multiplication differentiator cDNA fragment was introduced into the EcoRI recognition site which is an entry site of expression vector pdKCR–DHFR in a mammals cell lineage.

[0104] Animal cell expression vector pdKCR–DHFR (Oikawa, S., et al., Biochem.Biophys.Res.Comm., 164, 39, 1989) has the initial promotor of simian virus 40, a rabbit beta globin, and a dhfr (dehydrofolate reductase) gene with the derivative of pKCR (O' Hare, et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 78, 1527, 1981). In addition, the host cell in which the transformation was carried out by this expression vector is Escherichiacoli. SBM It is named 308, ***** to the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology, as Fermentation Research Institute ***** No. (FERMP–11506) 11506 on June 7, Heisei 2, and is FERM on February 18, 1993. The management was transferred to the international deposition based on Budapest Treaty as BP–4197.

[0105] It is Taq also about clone pdKCR–DHFR–TPO55 containing the megakaryocyte multiplication differentiator cDNA included in pdKCR–DHFR of the obtained expression vector. Dye Deoxy Terminator Cycle A Sequencing kit (Applied Biosystem) and fluorescence base–sequence–determination equipment (Applied Biosystem 370A type machine) were adopted, and it determined according to the attached run book. Consequently, an array number: It was in agreement with the array of 1236, and the array of oligomer NI078 and NI079 from the nucleotide number 99 of 30. Moreover, the megakaryocyte multiplication differentiator cDNA introduced into the vector also checked that it was the forward direction by determination of a base sequence to the promotor for a manifestation.

[0106] If there is only information on the nucleotide sequence of array number:30 so that it may be shown by the example of this paragraph, it is easier than arbitrary megakaryocyte multiplication differentiator manifestation cells (for example, A431 cell) for men of the same trade to amplify all the megakaryocyte multiplication differentiators cDNA and arbitrary portions, and to determine a base sequence and to clone to still more arbitrary expression vectors.

[0107] Example 4. Construction megakaryocyte multiplication differentiator cDNA clone pdKCR–DHFR–TPO55 of the manifestation (1) silkworm manifestation system vector of a megakaryocyte multiplication differentiator was digested by NotI, and it cut by the NotI recognition site artificially added to NI079. The NotI adhesion end produced by this was smoothed using the branching kit of TAKARA SHUZO CO., LTD., and the XbaI linker (TAKARA SHUZO CO., LTD.) was introduced into this flush end according to the attached run book.

[0108] Thus, the obtained plasmid was simultaneously digested by NruI and XbaI, it cut by the NruI recognition site artificially added to NI078, and the XbaI recognition site of the introduced XbaI linker, and the megakaryocyte multiplication differentiator cDNA fragment with a NruI adhesion end and a XbaI adhesion end was produced. pBm4 (more nearly available than National Institute of Sericultural and Entomological Science) which is a baculovirus transition vector for silkworm polyhedron viruses about this fragment was simultaneously digested by NruI and XbaI, it introduced into the NruI recognition site which is a transgenics part of pBm4, and pBm4–TPO55 was obtained.

[0109] (2) Production silkworm embryo origin cell-strain BoMo15AIIc (more nearly available than National Institute of Sericultural and Entomological Science) of a megakaryocyte multiplication differentiator recombination virus performed subculture at 25 degrees C by the culture medium which added the gentamycin (500microg/(ml)) to MGM448 as a fetal calf serum (FBS:Gibco BRL) and an antibiotic 10%. The megakaryocyte multiplication differentiator recombination virus was produced by introducing simultaneously silkworm coenocyte virogene DNA and pBm4-TPO55 plasmid DNA into a silkworm cultured cell for example, by the calcium phosphate coprecipitation method etc.

[0110] 2micro [of wild-type virus P6 E stocks (more nearly available than National Institute of Sericultural and Entomological Science) of genomic DNA] g, and transfer plasmid pBm4-TPO55 10microg is dissolved in the sterilized pure water of 240microl. Equivalent 0.5M CaCl₂, 0.1M After adding HEPES, mixing and leaving it at a room temperature for 10 minutes, It is 0.2M to this mixed liquor. NaCl, 0.05M HEPES, 0.75mM NaH₂ PO₄, 0.75mM Na₂ HPO₄ 480microl in addition, by leaving it for 20 to 30 minutes at a room temperature after several second stirring The calcium phosphate gel containing genomic DNA and a plasmid was made to form.

[0111] Next, 960micro (suspension) of calcium phosphate gel mixtures I containing virogene DNA obtained by making it this appearance and a transfer vector was added to the BoMo15AIIc cell rewound around MGM448(FBS and antibiotic are included 10%) 4ml in T flask (T25, Corning) of 2 25cm on the previous day, and they were left for 12 hours. The culture medium was exchanged for new MGM448 (FBS and an antibiotic are included 10%), and it cultivated at 25 degrees C. Culture media were collected on the 6th day of cultivation, and it considered as the virus undiluted solution.

[0112] The culture medium which it adds to the culture medium of the BoMo15AIIc cell which diluted the supernatant liquid which carried out centrifugal [of the culture medium], and defecated it, and was cultivated at the flat surface, and virus infection is looked at by microscope observation after cultivation for eight days, and the polyhedron does not form was chosen (limiting dilution). Mixing of the virus of a wild type was not accepted into this virus liquid. The recombination object virus containing DNA which carries out the code of the megakaryocyte multiplication differentiator produced here was set to TPO55-BmNPV.

[0113] (3) manufacture 25cm² of recombination object virus liquid a flask base -- about 1x10⁶ It rearranges. cloning of the BoMo15AIIc cell of a cell was carried out to the culture medium which carried out the plate culture for two days in the 4ml MGM448 culture medium which contains FBS 10% by the aforementioned (2) term -- a body virus 10micro of culture medium I of the included BoMo15AIIc cell is added into a BoMo15AIIc cell, and it is 1000rpm after cultivation and about culture medium for 14 days at 25 degrees C. At-long-intervals heart separation was carried out for 5 minutes, the centrifugal supernatant liquid was rearranged, and it obtained as body virus liquid.

[0114] (4) verification 25cm² of a manifestation of a recombination object megakaryocyte proliferation differentiator a flask base -- about 1x10⁶ it was obtained above by the culture medium which carried out the plate culture of the BoMo15AIIc cell of a cell for two days in the 4ml MGM448 culture medium which contains FBS 10% -- it rearranged, and it added into the BoMo15AIIc cell so that it might become the multiplicity of infection 0.5, and body virus liquid or the wild-type virus was cultivated for three days at 25 degrees C It was with Isogen (Wako Pure Chem) from the infected cell and the uninfected cell, and all RNA was collected.

[0115] All these RNA After giving 1microg to agarose electrophoresis and performing fractionation by the size, it moved to the Zetaprobe membrane (Bio-Rad) by capillarity. The specific complex of the recombination object megakaryocyte multiplication differentiator mRNA and megakaryocyte multiplication differentiator probe DNA was made to form by dipping into the hybridization buffer containing the megakaryocyte multiplication differentiator cDNA (array of the nucleotide number 449-1255 of PCR product; array number:30 by N2065 and KY100 which were obtained by example 2.1.) (megakaryocyte multiplication differentiator probe DNA) which carried out the indicator of this membrane by digoxigenin (BERINGA Mannheim), and keeping it warm at 42 degrees C for 12 hours.

[0116] After making the anti-digoxigenin antibody (BERINGA Mannheim) which combined the

alkaline phosphatase react to this complex, it rearranged by the chemistry firefly luminescence produced at the time of decomposition by the alkaline phosphatase of AMPPD (BERINGA Mannheim), and the body megakaryocyte proliferation differentiator mRNA was detected. As shown in drawing 11, it rearranged to all RNA of a TPO55-BmNPV infected cell, the body megakaryocyte proliferation differentiator mRNA was detected, and it was shown that the megakaryocyte proliferation differentiator mRNA is discovered within this infected cell.

[0117] (5) As the virus liquid of the recombination object virus obtained by this paragraph (2) to the silkworm larva of manufacture 5 ** of silkworm body fluid, and comparison contrast E stocks of wild-type virus B6 is diluted ten to one time, and it injects an animal 50microl. /. at 26 degrees C For four – five days, Commercial artificial breeding (mho lath : Katakura Kougyo make) was given, the abdomen of the silkworm of 50 animals was cut after breeding, it extracted to the plastic tube which ice-cooled the extract containing body fluid, the object in a midgut, etc., and the supernatant liquid of centrifugal separation was obtained.

[0118] (6) They are 20mM(s) in 50ml of silkworm body fluid obtained by the activity check this paragraph (5) of a megakaryocyte proliferation differentiator. Matrex which dialyzed enough to the Tris/HCl (pH 7.4) buffer solution, and equilibrated with the same buffer solution The activity in the silkworm body fluid which carried out fractionation in the BlueA column (phi2.5x15cm), and injected with the recombinant virus and the wild-type virus was compared. Elution of a binding protein performed the uncombined fraction by making the concentration gradient of NaCl after [0–1M] washing fully form. As shown in drawing 12, the megakaryocyte guidance activity in the body fluid which injected with recombination virus liquid showed the high price more clearly than the activity of the body fluid origin which injected with the wild-type virus.

[0119] The method indicated by this specification is not limited to the silkworm baculovirus transition vector pBm4, silkworm polyhedron virus P6E stock, and a silkworm cell BoMo15AIIc cell. for example, it is easy for this contractor to obtain a physiological active substance equivalent to this using other baculovirus transition vectors (for example, more nearly available pBK283 and more than pBKblue; than Funakoshi Co., Ltd.), a silkworm polyhedron virus (more nearly available as refined DNA than Funakoshi Co., Ltd.), and a silkworm cell (BmN4 cell; — more nearly available than Funakoshi Co., Ltd.)

[0120]

[Effect of the Invention] The megakaryocyte proliferation differentiator newer than A431 cell-culture supernatant liquid was refined, and the property and partial amino acid structure were determined. It was admitted that the last preparation refined this time promoted production of a megakaryocyte from the marrow cell under existence of IL-3. This factor has achieved the important regulation function in the proliferation specialization process of a megakaryocyte, and is in. It works as a thrombocytosis factor also by vivo. Therefore, this factor can change with an effective therapeutic drug also to control of the platelet count which decreases by the radiation irradiation at the time of a bone marrow transplantation only to the various hematogenous disorders accompanied by reduction in a platelet which have a big problem on clinical, control of the platelet count at the time of the chemotherapy of cancer, etc.

[0121]

[Layout Table]

array number: — length [of one array]: — mold [of nine arrays]: — amino acid topology: —

配列 :

Xxx Glu Thr Ile Asn Xxx His Phe Lys

1 5 9

kind [of straight chain-like array]: — a peptide

[0122] array number: — length [of two arrays]: — mold [of seven arrays]: — amino acid

配列 :

Xxx Gln Xxx Ala Phe Thr Lys

1 5 7

topology: — kind [of straight chain-like array]: — a peptide

[0123] array number: — length [of three arrays]: — mold [of 19 arrays]: — amino acid

topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- peptide array: Val Glu Xxx Val Asp Phe Thr Asn His Leu Glu Asp Thr Xxx Xxx One 5 10 15Asn Ile Asn Lys 19 [0124] array number: -- length [of four arrays]: -- mold [of 17 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- peptide array: -- Xxx Tyr Ile Glu Val Thr Glu Glu Gly Thr Glu Ala Xxx Ala Ala One 5 10 15Xxx Gly 17 [0125] array number: -- length [of five arrays]: -- mold [of nine arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- a peptide
配列:

Xxx Tyr Leu Arg Ala Leu Gly Leu Lys
1 5 9

[0126] array number: -- length [of six arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- peptide array: -- Ala Asp Leu Ser Gly Ile Ala Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Ile Ser One 5 10 15Arg Met Xxx Gly Lys 20 [0127] array number: -- length [of seven arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like
配列:

Leu Tyr Asp Ala Lys

array]: -- a peptide 1 5

[0128] array number: -- length [of eight arrays]: -- mold [of five arrays]: -- amino acid
配列:

Asn Tyr Glu Met Lys

topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- a peptide 1 5

[0129] array number: -- length [of nine arrays]: -- mold [of ten arrays]: -- amino acid topology: -- kind [of straight chain-like array]: -- a peptide
配列:

Ala Val Ala Met Met His Gln Xxx Arg Lys
1 5 10

[0130] array number: -- length [of ten arrays]: -- mold [of 38 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- feature [of a synthetic DNA array]: -- the amino acid sequence of the array number 3 -- translation correspondence I -- inosine array: -- GTIGARIIG TIGAYTTYAC IAAYCAYTI GARGAYAC 38 [0131] array number: -- length [of 11 arrays]: -- mold [of 32 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- feature [of a synthetic DNA array]: -- the amino acid sequence of the array number 4 -- translation correspondence I -- inosine array: -- TACATCGAIG TIACIGARGA RGGIACNGAR GC 32 [0132] array number: -- length [of 12 arrays]: -- mold [of 37 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- feature [of a synthetic DNA array]: -- 3'-RACE oligomer array [of Kit (Gibco BRL) appending]: -- GGCCACGCGT CGACTAGTAC TTTTTTTTTT TTTTTTTT 34 [0133] array number: -- length [of 13 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- ATGTTGTGGG GACTGCTATA 20 [0134] array number: -- length [of 14 arrays]: -- mold [of 23 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CAAGGCGAAT GACCTCTAAG TAT 23 [0135] array number: -- length [of 15 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CCCCAGCA ATCCCAGAGA G 21 [0136] array number: -- length [of 16 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CTCAGGCAGC AGAACGTACA T 21 [0137] array number: -- length [of 17 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: --

GGCGACGACT CCTGGAGCCC G 21 [0138] array number: -- length [of 18 arrays]: -- mold [of 22 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- GACACCAGAC CAACTGGTAA TG 22 [0139] array number: -- length [of 19 arrays]: -- mold [of 36 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAAT 36 [0140] array number: -- length [of 20 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- GCTGTGGCCA TGATGCACCA G 21 [0141] array number: -- length [of 21 arrays]: -- mold [of 24 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- TACCTGCGGG CCCTGGGCCT GAAG 24 [0142] array number: -- length [of 22 arrays]: -- mold [of 51 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CATCCGGGAG ATGTACAGCC GGCCGCCAGA GGCAATGCCA GACAGGTCAG C 51 [0143] array number: -- length [of 23 arrays]: -- mold [of 17 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- GTTTTCCCAG TCACGAC 17 [0144] array number: -- length [of 24 arrays]: -- mold [of 17 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CAGGAAACAG CTATGAC 17 [0145] array number: -- length [of 25 arrays]: -- feature [of 20 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- AATTATGGCC CACACCAGTG 20 [0146] array number: -- length [of 26 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- ACTAGCCGCT ACAGTCAACA 20 [0147] array number: -- length [of 27 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- TTGCCACTTG CCTTTGAAGT A 21 [0148] array number: -- length [of 28 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA array: -- CTGATGCATC ATGGCGACTG C 21 [0149] array number: -- length [of 29 arrays]: -- mold [of 21 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- a synthetic DNA Array: AGCATTACCC AGCACCATTA C 21 [0150] array number: -- length [of 30 arrays]: -- mold [of 1950 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- double strand topology: -- kind [of straight chain array]: -- complimentaryDNA (cDNA)

Origin Organism name: Homo sapiens (A431 cell)

The feature of an array: DNA array which carries out the code of the Homo sapiens megakaryocyte proliferation differentiator : [0151]

GGCAGGAGAG-GAACTGAAGC-CCAGCTGTGA-AGGCCGCAGA-CTGCAGTGAG 50
 AGGAGGCTGC ACTCCATTTT GCA ATG GCC TCC-CTT-GCT-GCA-GCA AAT 97 Met-Ala-Ser-Leu-Ala Ala Ala Asn 1 5 GCA GAG TTT TGC TTC AAC CTG TTC AGA GAG ATG GAT
 GAC AAT CAA142 Ala Glu Phe Cys Phe Asn Leu Phe Arg Glu Met Asp Asp Asn Gln 10 1520
 GGA AAT GGA AAT GTG TTCTTT TCC TCT CTG AGC CTC TTC GCTGCC 187 Gly Asn Gly
 Asn ValPhe Phe Ser Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala 25 30 35 CTG GCC CTG GTC CGC TTG
 GGC Greenwich civil time CAA GAT GAC TCC CTCTCT CAG232 Leu Ala Leu Val Arg Leu Gly
 Ala Gln Asp Asp Ser Leu Ser Gln 40 45 50 ATT GAT AAG TTG CTT CAT glucose tolerance test
 AACACT GCC TCA GGA TAT GGA AAC 277 Ile Asp Lys Leu Leu HisVal Asn Thr Ala Ser Gly
 Tyr Gly Asn 55 60 65 TCT TCT AAT AGT CAG TCA GGG CTC CAG TCT CAA CTG AAA AGA
 glucose tolerance test 322Ser Ser Asn Ser Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gln Leu Lys Arg Val 70 75
 80 TTT TCT GAT ATA AAT GCA TCC CAC AAG GAT TAT GAT CTC AGC ATT 367Phe Ser
 Asp Ile Asn Ala Ser His Lys Asp Tyr Asp Leu Ser Ile 85 90 95 GTG AAT GGG CTT TTT
 Greenwich civil time GAA AAA GTG TAT GGC TTT CAT AAG GAC 412Val Asn Gly Leu Phe Ala
 Glu Lys Val Tyr Gly Phe His Lys Asp 100 105 110 TAC ATT GAG thromboplastin generation test
 GCC GAA AAA TTA TAC GAT GCC AAA GTG GAG CGA 457Tyr Ile Glu Cys Ala Glu Lys Leu
 Tyr Asp Ala Lys Val Glu Arg 115 120 125 glucose tolerance test GAC TTT ACG AAT CAT TTA
 GAA GAC ACT AGA CGT AAT ATT AAT 502 Val Asp Phe Thr AsnHis Leu Glu Asp Thr Arg Arg

Asn Ile Asn 130 135 140 AAG TGG glucose tolerance test GAA AAT GAA ACACAT GGC AAA
 ATC AAG AAC GTG ATT 547 Lys Trp Val Glu AsnGlu Thr His Gly Lys Ile Lys Asn Val Ile 145
 150 155 GGT GAA GGT GGC ATA AGC TCA TCT Greenwich civil time GTA ATG GTG CTG
 GTG AAT 592 Gly Glu Gly Gly IleSer Ser Ser Ala Val Met Val Leu Val Asn 160 165 170
 Greenwich civil time GTG TAC TTC AAA GGC AAGTGG CAA TCA GCC TTC ACC AAG AGC
 637 Ala Val Tyr Phe LysGly Lys Trp Gln Ser Ala Phe Thr Lys Ser 175 180 185 GAA ACC ATA
 AAT TGC CAT TTC AAA TCT CCC AAG TGC TCT GGG AAG 682 Glu Thr Ile Asn CysHis Phe
 Lys Ser Pro Lys Cys Ser Gly Lys 190 195 200 GCA GTC GCC ATG ATG-CAT-CAG-GAA-CGG
 AAG TTC AAT TTG TCT GTT 727 Ala Val Ala Met Met His Gln-Glu-Arg-Lys-Phe Asn Leu Ser
 Val 205 210 215 ATT GAG GAC CCA TCA-ATGAAGATT CTT GAG CTC AGA TAC AAT GGT
 772 Ile Glu Asp Pro Ser Met Lys Ile Leu Glu Leu Arg Tyr Asn Gly 220 225 230 GGC ATA AAC
 ATG TAC glucose tolerance test CTG CTGCCT GAG AAT GAC CTC TCT GAA 817 Gly Ile Asn
 Met Tyr ValLeu Leu Pro Glu Asn Asp Leu Ser Glu 235 240 245 ATT GAA AAC AAA CTG ACC
 TTT CAG AAT CTA ATG GAA TGG ACC AAT 862 Ile Glu Asn Lys LeuThr Phe Gln Asn Leu Met
 Glu Trp Thr Asn 250 255 260 CCA AGG CGA ATG ACC TCT AAGTAT glucose tolerance test
 GAG GTA TTT TTT CCT CAG 907 Pro Arg Arg Met ThrSer Lys Tyr Val Glu Val Phe Phe Pro
 Gln 265 270 275 TTC AAG ATA GAG AAG AAT TAT GAA ATG AAA CAA TAT TTG AGA GCC
 952 Phe Lys Ile Glu LysAsn Tyr Glu Met Lys Gln Tyr Leu Arg Ala 280 285 290 CTA GGG CTG
 AAA GAT ATC TTTGAT GAA TCC AAA GCA GAT CTC TCT 997 Leu Gly Leu Lys AspIle Phe
 Asp Glu Ser Lys Ala Asp Leu Ser 295 300 305 GGG ATT Greenwich civil time TCG GGG GGT
 CGT CTG TAT ATA TCA AGG ATG ATG CAC 1042 Gly Ile Ala Ser GlyGly Arg Leu Tyr Ile Ser
 Arg Met Met His 310 315 320 AAA TCT TAC ATA GAG GTC ACTGAG GAG GGC ACC GAG
 Greenwich civil time ACT Greenwich civil time 1087 Lys Ser Tyr Ile GluVal Thr Glu Glu Gly Thr
 Glu Ala Thr Ala 325 330 335 GCC ACA GGA AGT AAT ATT GTA GAA AAG CAA CTC CCT
 CAG TCC ACG 1132 Ala Thr Gly Ser AsnIle Val Glu Lys Gln Leu Pro Gln Ser Thr 340 345 350
 CTG TTT AGA Greenwich civil time GAC CAC CCATTC CTA TTT glucose tolerance test ATC
 AGG AAG GAT 1177 Leu Phe Arg Ala AspHis Pro Phe Leu Phe Val Ile Arg Lys Asp 355 360 365
 GAC ATC ATC TTA TTC AGT GGC AAA glucose tolerance test TCT TGC CCT TGA 1216 Asp
 Ile Ile Leu PheSer Gly Lys Val Ser Cys Pro... 370 375 380 AAATCCAATT GGTTCCTGTT
 ATAGCAGTCCCCACAACATC AAAGAACCAC 1266 CACAAGTCAA TAGATTTGAG
 TTTAATTGGA AAAATGTGGT GTTTCCTTTG 1316 AGTTTATTTT TTCCTAACAT
 TGGTCAGCAG ATGACACTGG TGA CTGACC 1366 CTTCCTAGACACCTGGTTGA
 TTGTCCTGAT CCCTGCTCTT AGCATTCTAC 1416 CACCATGTGT CTCACCCATT TCTAATTT
 CA-TTGTCTTTCT-TCCCACGCTC 1466 ATTTCTATCA TTCTCCCCCA-TGACCCGTCT
 GGAAATTATG GAGAGTGCTC 1516 AACTGGTAAG GAGAACGTAG-AAGTAGCCCT
 AGGGATCCTT TTTGAAACTC 1566 TACAGTTATC GCAGATATTC-TAGCTTCATT
 GTAAGCAATC TAGGAAATAA 1616 GCCCTGC TGC TTTCTAGAAA TAAGTGTGAA
 GGATAAATTT TCTTTGTTGA 1666 CCTATGAAGA TTTTAGAGTT TACCTTCATA
 TGTTTGATTT TAAATCAGTG 1716 TATAATCTAG ATGGTAAAAA ATGTGAAATT
 GGGATTAGGG ACCAACC AAA 1766 ATATTTTCATT AATGCTTTCA ATTGACAAAT
 TTTGGTCTTT CTTTGATAAG 1816 ACAATATGTA CATAGTTTTT TCAAATATTA
 AAGATCTTTT AACTGTTGGC 1866 AGTTGTTATC TACAGAATCA TATCTCATAT
 GCTGTGTAGT TTATAAGTTT 1916 TTTCTCTATT TATCAGAATA AAGAAATACA ACAT 1950
 [0152] array number: -- length [of 31 arrays]: -- mold [of 20 arrays]: -- number [of nucleic-
 acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- the synthetic DNA origin
 organism name: -- feature [of a Homo sapiens array]: -- 5' non-translating field array: --
 AACTGAAGCC CAGCTGTGAA 20 [0153] array number: -- length [of 32 arrays]: -- mold [of
 37 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain
 array]: -- synthetic DNA array: -- CTCGAATTCTG CGATGGCCTC CTTTGCTGCA GCAAATG
 37 [0154] array number: -- length [of 33 arrays]: -- mold [of 49 arrays]: -- number [of
 nucleic-acid chains]: -- 1 chain topology: -- kind [of straight chain array]: -- synthetic DNA
 array: -- GGGGAATTCGC GGCCGCGTGG TGGTTCTTTG ATGTTGTGGG GACTGCTAT 49

[Translation done.]